

Follikkelia stimuloivan hormonin reseptorin (*FSHR*) ilmentyminen  
trofoblastin erilaistuessa pluripotentista kantasoluista

Pro gradu  
Pia Väyrynen

Helsingin yliopisto  
Biotieteiden laitos  
Perinnöllisyystieteen osasto

2017



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Pia Väyrynen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Follikkelia stimuloivan hormonin reseptorin ( <i>FSHR</i> ) ilmentyminen trofoblastin erilaistessa pluripotentista kantasoluista			
Oppiaine – Läroämne – Subject Perinnöllisyystiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu		Aika – Datum – Month and year Marraskuu 2017	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 78 s. + Liitteet 2 s.
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Follikkelia stimuloivalla hormonilla (FSH) sekä follikkelia stimuloivan hormonin reseptorilla (FSHR) on tärkeä merkitys nisäkkään lisääntymiskyvyn säätelyssä. FSH on olennainen hormoni esimerkiksi sukurauhasten kehityksessä. Tutkielmani on osa tutkimusryhmämme Sertoli-projektia, joka keskittyy sukurauhasten erilaistumisen mallintamiseen. Tässä tutkielmassa tarkoitus oli selvittää <i>FSHR</i>-geenin ilmentymistä erilaistuvissa pluripotentissa kantasoluissa kahdella erilaisella soluviljelyprotokollalla.</p> <p>Ensimmäinen protokollista kehitettiin alun perin intermediaarisen mesodermin ja siitä edelleen bipotentiaalisen sukurauhasen solujen erilaistamiseksi (D-protokolla). Viljelyprotokollan huomattiin johtavan <i>FSHR</i>-positiivisten solujen erilaistumiseen. Kehitysbiologisesti liian varhainen ilmentyminen ei voinut viitata erilaistuneisiin granuloosa- tai Sertolin soluihin, joten ekspression alkuperä vaati selvitystä. Vaihtoehtoisena selityksenä ekspressiota haluttiin tutkia protokollalla, jolla erilaistetaan trofoblastin soluja. Tutkimuskirjallisuuden mukaan <i>FSHR</i>-geeniä ekspressoituaan sukurauhasten ulkopuolella: esimerkiksi naisen ei-raskaudenaikaisen lisääntymiselimistön endoteelisoluissa (kohtu, kohdunkaula ja kohdun lihaskerroksen lihassytyt) sekä raskauden aikana istukan endoteelisoluissa ja sikiökalvojen epiteelissä. Tarkoitus oli selvittää, voisiko D-protokolla johtaa joidenkin toistaiseksi tuntemattomien, <i>FSHR</i>-positiivisten alkionulkoisten solujen syntyyn. Eräs tällainen solutyyppi voisi olla juuri trofoblastin solut, jotka <i>in vivo</i> muodostavat uloimman kerroksen blastokystistä.</p> <p>Tavoite oli siis selvittää signaalin lähde. Mikäli ekspressiota ilmenisi, reseptorin toimintakykyä tutkittaisiin eksogeenisellä FSH-stimulaatiolla ja cAMP-mittauksella. FSH:n kyky säädellä kasvua ja pubertaalikehitystä perustuu sen sitoutumiseen reseptoriinsa. Sitoutuminen aktivoi hormoni-reseptori-kompleksin ja johtaa signaalinvälitysketjun etenemisen kautta toisiolähtetin, syklisen AMP:n tuotantoon. Tuloksia vertailtiin kolmella eri solulinjalla. Villityypin kontrollina käytettiin kaupallista ihmisalkion kantasolulinjaa (H9). Vertailussa käytettiin lisäksi kahta erillistä, potilasperäistä indusoitua pluripotenssisolulinjaa. Mutatoituneet potilaslinjat olivat homotsygoottisia tietyille <i>FSHR</i>-geenin pistemutaatioille, joka johtaa signaalinvälitysketjun vaurioitumisen myötä reseptorin toiminnan salpautumiseen. Kummatkin pluripotentit solutyypit ilmentävät kuitenkin normaalia erilaistumispotentiaalia kaikkien alkiolehtien solutyypin ja mitä ilmeisemmin trofoblastin muodostumiseen. Potilaslinjoista haluttiin selvittää, miten <i>FSHR</i>-mutaatiot ilmenevät ja miten niiden solut erilaistuvat villityypin verrattuna.</p> <p>Soluja viljeltiin ja erilaistettiin kahdella erilaisella soluviljelyprotokollalla <i>in vitro</i>. Viljelyolosuhteet perustuivat sellaisiin viljelykomponentteihin ja kasvutekijöihin, joiden tiedetään aktivoivan haluttuja transkriptiotekijöitä ja signaalintekijöitä. Lopputuloksena molemmat protokollat johtivat <i>FSHR</i>-positiivisten, heterogeenisten solupopulaatioiden syntyyn. mRNA-ekspressiosta huolimatta tuotettu reseptoriproteiini ei ollut funktionaalinen trofoblastiprotokollan soluissa edes H9-kontrollisolulinjalla. D-protokollan solut sen sijaan ilmensivät <i>FSHR</i>-geeniä korkealla tasolla kaikilla solulinjoilla, ja vastakohtana potilaslinjoille, kontrollisolujen tuottama <i>FSHR</i>-proteiini osoittautui toimintakykyiseksi kykenemällä aktivoimaan cAMP-tuotantoa. Molemmat protokollista johtivat alkionulkoisten merkkigeenien ekspression kasvuun (erityisesti <i>HAND1</i> ja <i>GATA6</i>), mikä viittaa alkion ulkopuolisten solujen erilaistumiseen. Trofoblastiprotokolla suosii todennäköisesti enemmän trofoblastisia soluja, mikä näkyy trofoblastimerkkigeenien korkeana mRNA-ekspressiona, toisin kuin D-protokolla, jonka olosuhteissa viljelmiin erilaistuu niin alkiolinjaan kuuluvia kuin alkionulkoisiakin soluja. D-protokollan <i>FSHR</i>-ekspressio oli kuitenkin merkittävästi korkeampaa. Tulokset viittaavat <i>FSHR</i>-ekspression olevan peräisin joistakin alkionulkoisista soluista, joita ei vielä osata tarkkaan määrittellä. Jatkotutkimusten myötä solujen identiteetin odotetaan selkeytyvän.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>FSHR</i> -mutaatiot, trofoblasti, pluripotenttien kantasolujen erilaistaminen, BMP-signaali, GATA3, GATA6, <i>HAND1</i> , <i>KRT7</i>			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Karolina Lundin ja Timo Tuuri			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Perinnöllisyystieteen osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Tiivistelmä suomeksi ja englanniksi			



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos – Institution – Department Department of Biosciences	
Tekijä – Författare – Author Pia Väyrynen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Expression of the follicle-stimulating hormone receptor ( <i>FSHR</i> ) in trophoblast lineage cells derived from pluripotent stem cells			
Oppiaine – Läroämne – Subject Genetics			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's thesis		Aika – Datum – Month and year November 2017	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 78 p. + Appendices 2 p.
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Several aspects of mammalian reproduction are regulated by the interaction of follicle-stimulating hormone (FSH) and the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR). For one, FSH promotes the development of sex glands – the research topic of our research group. As part of the main focus of the group, the purpose of this thesis was to see if <i>FSHR</i> would be expressed in cells differentiated from pluripotent stem cells using two protocols for distinct differentiation attempts.</p> <p>The first protocol was originally intended for embryonal cell differentiation towards intermediate mesoderm and eventually bipotential gonad (protocol D) that had already been noted to upregulate <i>FSHR</i> mRNA. The source of the expression needed to be studied since expression at that early stage of differentiation could not originate from the differentiating Sertoli or granulosa cells. As for an alternative explanation, the other protocol for differentiation of trophoblast was tested for <i>FSHR</i> expression. Research has yielded proof that <i>FSHR</i> is expressed outside of gonads; e.g. in endothelial cells of the non-pregnant female reproductive system (uterus, cervix, myometrium muscle fibers) and in pregnancy-related endothelial cells of the placenta and epithelial cells of the fetal membranes. Thus, it was hypothesized that the <i>FSHR</i> expression seen in protocol D might stem from some unidentified, extraembryonal source, which develops in the cultures: for instance trophoblast, the outer layer of blastocyst.</p> <p>Hence, the aim was to clarify where the <i>FSHR</i> signal is coming from. If expression were detected, the functional abilities of the receptor would be resolved by stimulating the cells with exogenous FSH. FSH is known to regulate e.g. development, growth, pubertal maturation and fertility. FSH gains its biofunctions by binding as a ligand to FSHR, activating the hormone-receptor complex and leading to the transduction of the signal and the synthesis of the second messenger, cyclic AMP (cAMP). Results from three different cell lines were compared. As wild type control, a commercial human embryonic stem cell line (H9) was used. In addition, two separate patient-derived induced pluripotent stem cell lines were analyzed in the study. The mutated patient lines were homozygous for a specific point mutation in the <i>FSHR</i> gene, causing disruption in the signal transduction and disabling the function of the receptor. Both types of pluripotent cells maintain their differentiation potential to form derivatives of the embryonic germ layers and, debatably, trophoblast. In case of patient lines, especially two things were of interest: the manifestation of the <i>FSHR</i> mutations and whether the patient cells differentiate the same way as the wild type cells.</p> <p>Consequently, the cells were cultured and differentiated <i>in vitro</i> with two different protocols, using specific culture components and growth factors that are known to activate certain transcription factors and signaling pathways. As an outcome, both protocols produced heterogeneous cell populations, positive for <i>FSHR</i>. Despite the mRNA expression, the receptor protein in the trophoblast protocol proved to be non-functional, even with the wild type cells. Protocol D, on the other hand, resulted in high expression of <i>FSHR</i> with all cell lines. In contrast to the mutated patient cells, the FSH receptor protein in the wild type cells was functional and able to trigger production of cAMP. Both protocols also led to simultaneous upregulation of several extraembryonic gene markers (especially <i>HAND1</i>, <i>GATA6</i>). This suggests that both protocols probably induce differentiation into extraembryonic cell lineages. The trophoblast protocol arguably favours trophoblast-like cells due to significant upregulation of trophoblast markers as opposed to protocol D, which appears to produce both somatic as well as extraembryonic cells. As the <i>FSHR</i> expression in protocol D was notably higher, the results indicate that <i>FSHR</i> expression localizes to some extraembryonic cells but the identity of these cells is still unknown. Further investigation is expected to unravel the details about the identification and the characterization of the cells.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>FSHR</i> mutations, trophoblast, differentiation of pluripotent stem cells, BMP signaling, GATA3, GATA6, HAND1, KRT7			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Karolina Lundin and Timo Tuuri			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Department of Genetics			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Abstract in Finnish and in English			

# Sisällysluettelo

Lyhenteet.....	1
1. Johdanto.....	2
Follikkelia stimuloiva hormoni ja FSH-reseptori.....	2
<i>FSHR</i> -mutaatiot.....	5
Alkion varhaiskehitys ja kehityslinjan määräytyminen.....	7
Signalointi: tärkeimmät trofoblastin erilaistumiseen vaikuttavat molekyylit.....	9
BMP:t.....	10
FGF:t.....	10
Muut kasvutekijät.....	11
Tärkeimmät transkriptiotekijät.....	12
Trofoblastin erilaistuminen.....	13
Kehityksen mallintaminen.....	15
Pluripotenttien solujen erilaistaminen ja protokollien valinta.....	17
Tutkielman tavoite.....	19
2. Yleiset materiaalit ja menetelmät.....	20
Soluviljely.....	20
Trofoblastiprotokolla.....	20
D-protokolla.....	21
RNA-keräys kuoppalevyiltä tai maljalta.....	22
RNA-eristys, DNAasi-käsittely ja RNA:n puhdistus.....	23
cDNA-kääntö.....	23
qPCR.....	24
FSH-stimulaatio.....	24
cAMP-analyysi.....	25
Immunosytokemialliset värjäykset.....	25
3. Tulokset.....	27
Trofoblastiprotokollan aikaansaama soluerilaistuminen.....	27
Ravinneliuoksen vaihtovälin vaikutus.....	32
Solujen erilaistuminen D-protokollan viljelmissä.....	35

FSH-stimulaatio.....	38
Trofoblastiprotokolla.....	38
D-protokolla .....	40
cAMP-analyysi .....	41
FSH-reseptorin paikantuminen solussa .....	42
4. Tulosten tarkastelu.....	44
D-protokollan myötä erilaistunut, heterogeeninen solupopulaatio.....	44
Trofoblastin kaltaisten solujen erilaistuminen pluripotentista kantasoluista .....	46
Ravinneliuoksen ihanteellinen vaihtoväli.....	47
Muiden solujen erilaistuminen trofoblastiprotokollalla ja protokollan optimaalisuus .....	47
<i>FSHR</i> -ekspression alkuperä.....	50
<i>FSHR</i> -proteiinin lokalisaatio.....	54
D-protokollan kontrollisoluissa toiminnallinen <i>FSHR</i> -proteiini .....	56
Solulinjajerojen tulkintaa.....	59
Tulkinnan sudenkuopat ja tarvittavat analysointimenetelmät .....	61
Vaihtelu toistojen välillä.....	61
Karakterisaatioon lisää menetelmiä.....	62
5. Johtopäätökset.....	63
Kiitokset.....	64
Kirjallisuus .....	65
LIITE 1. Materiaalit ja menetelmät.....	79

## Lyhenteet

BMP:t	luun morfogeeniset proteiinit, <i>bone morphogenic proteins</i>
BRA	<i>T (Brachyury) transcription factor</i>
cAMP	3', 5' -syklinen adenosiinimonofosfaatti, <i>cyclic AMP</i>
cDNA	komplementaarinen DNA, <i>complementary DNA</i>
CDX2	<i>caudal-type homeobox transcription factor 2</i>
DLX5	<i>distal-less homeobox 5</i>
ECD	solunulkoinen domeeni, <i>extracellular domain</i>
FGF:t	fibroblastikasvutekijät, <i>fibroblast growth factors</i>
FSH	follikkelia stimuloiva hormoni, follitropiini
FSHR	FSH-reseptori
GATA3/4/6	<i>GATA binding factor 3/4/6</i>
GPCR	G-proteiinikytkentäinen reseptori, <i>G protein coupled receptor</i>
HAND1	<i>heart and neural crest derivatives-expressed protein 1</i>
hCG	ihmisen istukkahormoni, <i>human chorionic gonadotropin</i>
HLA-G	<i>human leukocyte antigen G</i>
MAPK/ERK	mitogeeniaktivoituva proteiinikinaasi, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
OCT4	POU5F1, <i>POU domain, class 5, transcription factor 1</i>
PKA	proteiinikinaasi A
KRT7	sytokeratiini 7, <i>type II cytoskeletal 7 keratin</i>
PBS	fosfaatti-puskuroitu suolaliuos, <i>phosphate buffered saline</i>
qPCR	kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RT-reaktio	käänteiskopiointi, <i>reverse transcription</i>

# 1. Johdanto

Tutkimusryhmämme Helsingin Naistenklinikan tutkimuslaboratoriossa keskittyy sukurauhasten kehityksen mallintamiseen. Professori Juha Tapanaisen johtaman Sertoli-projektin pitkäaikaisena tavoitteena on ollut kehittää soluviljelyprotokolla ihmisen pluripotenttien kantasolujen erilaistamiseksi intermediaarisen mesodermin soluiksi ja siitä eteenpäin seuraavan kehitysvaiheen, bipotentiaalisen sukurauhasen somaattisiksi soluiksi. Ryhmässä tutkitaan myös sukurauhasten kehitystä ja toimintaa häiritseviä tekijöitä.

Follikkelia stimuloivan hormonin reseptorin (FSHR) merkitystä alkuvaiheen yksilönkehityksessä tai sitä simuloivassa pluripotenttien kantasolujen erilaistumisessa ei ennestään tunneta hyvin. Protokollien kehittelyn ja optimoinnin lomassa havaittiin hieman yllättäen, että tietyllä protokollalla viljeltyt kantasolut ilmentävät *FSHR*-geeniä korkealla tasolla. Luonnollisesti tämä herätti toiveita granuloosisolujen tai Sertolin solujen varhaisesta erilaistumisesta. Alkupaivista lähtien korkea geeniekspressio ajoittuu kuitenkin kehitysbiologisesti selvästi aikaan ennen sukurauhassolujen erilaistumista, joten syytä tälle lähdettiin etsimään muualta.

Tutkimusten mukaan FSH-reseptoria ilmennetään raskauden aikana alkiota ympäröivissä soluissa. Voisiko olla, että protokolla johtaisi alkionlinjan solujen erilaistumisen ohella alkion ulkopuolisten solujen, esimerkiksi trofoblastin erilaistumiseen ja sen myötä *FSHR*-ekspressioon?

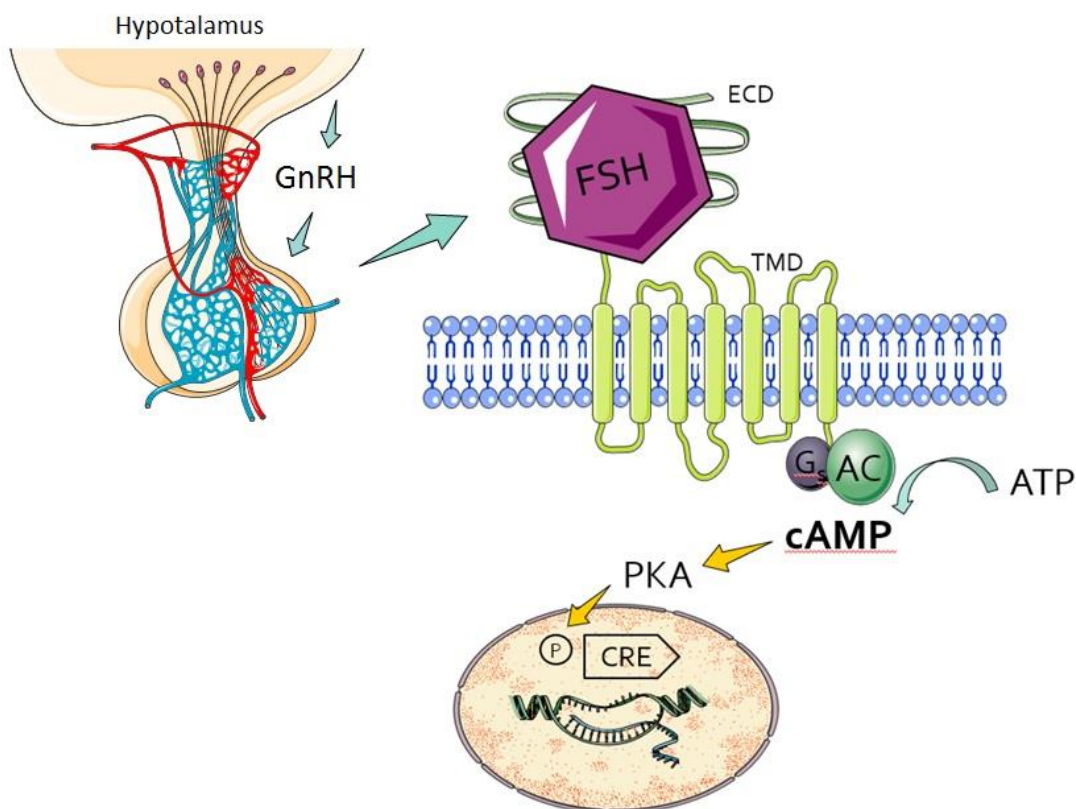
## Follikkelia stimuloiva hormoni ja FSH-reseptori

Follikkelia stimuloiva hormoni (FSH tai follitropiini) on yksi aivolisäkkeen tuottamista gonadotrooppisista hormoneista (Simoni & Nieschlag 1995). Gonadotropiinien erityistä säätelee hypotalamuksen pulssittainen gonadotropiineja vapauttava hormoni, GnRH eli gonadoliberiini (Clayton 1988) sekä sukurauhasten takaisinsäätelyjärjestelmä steroidi- ja proteiinipohjaisten tekijöiden välityksellä (Evans 1999). FSH liittyy olennaisesti lisääntymiskykyyn: se osallistuu sukupuoliseen kehitykseen säätelemällä muun muassa sukurauhasten ja sukusolujen kypsymistä. Toimintaa tukevat FSH:n ohella muut aivolisäkkeen gonadotropiinit, kuten luteinisoiva hormoni (LH) sekä tyreotropiini (TSH) (Ulloa-Aguirre ym. 2013).

FSH vaikuttaa kohdesoluihinsa sitoutumalla solukalvolla sijaitsevaan follitropiinireseptoriin. Reseptoria koodaava *FSHR*-geeni sijaitsee kromosomissa 2p21–p16 ja se koostuu yhteensä 10 eksonista, joita erottavat 9 intronia (Gromoll ym. 1996; Ulloa-Aguirre & Timossi 1998). Aminohapposekvenssi muodostuu yhteensä 695 aminohaposta ja sen molekyylipaino on 78 kilodaltonia. FSH-reseptori kuuluu G-proteiinikytkentäisiin reseptoreihin (GPCR), joille

luonteenomaisesti reseptorin sisäpuolinen osa on yhdistyneenä G-proteiiniin (Ulloa-Aguirre ym. 2013). G-proteiinit puolestaan ovat erittäin tärkeimmistä solun signaalinvälityksen molekyyleistä.

GPCR:t koostuvat seitsemästä solukalvon läpäisevästä domeenista (Nataraja ym. 2015). Transmembraanidomeeni kytkee gonadotropiinireseptoreille tyypillisen, aminopäässä sijaitsevan solunulkoisen domeenin karboksyylipään solunsisäiseen domeeniin. Transmembraanidomeeni on erityisen konservoitunut, ja alueella on runsaasti samankaltaisuutta muihin gonadotropiini-reseptoreihin, kuten LHR ja TSHR (Simoni ym. 1997). Solukalvon lävistävään transmembraanidomeeniin on kiinnittynyt leusiinipitoinen solunulkoinen domeeni, ECD (extracellular domain). ECD:n alueella tapahtuu pääasiainen ligandien tunnistus ja sitominen (Ulloa-Aguirre ym. 2013). Kyseinen ektodomeeni koostuu tyypillisesti leusiinipitoisista toistojaksoista. Juuri tämä toistojakso on se alue, johon hormoniligandi kiinnittyy FSH-reseptoriin sitoutuessaan (Jiang ym. 1995). ECD on täten merkittävässä asemassa signaalinvälitysketjussa, sillä se osallistuu ligandin sitomisen kautta reseptorin aktivaatioon [Kuva 1].



**Kuva 1.** Ligandin sitoutumisen laukaisema agonistinen FSH-reseptorin (FSHR) aktivaatio. Hypotalamuksen erittämä gonadoliberiini (GnRH) vapauttaa FSH:n erityksen aivolisäkkeestä. FSH-ligandi kiinnittyy reseptorin solunulkoiseen domeenin (ECD) leusiinipitoiselle alueelle. FSHR aktivoituu, jolloin G<sub>s</sub>-adenyylaattisyklaasin (AC) tehostamana syklistä AMP:ta (cAMP) tuotetaan ATP:sta. Solunsisäinen cAMP-tasojen nousu aktivoi proteiinkinaasi A:n (PKA), jonka aktivaatio vaikuttaa geenien säätelyyn fosforyloimalla transkriptiotekijöitä syklisen AMP:n vaste-elementtien (CRE) välityksellä.



FSH:n sitoutumisen käynnistämä reseptorin aktivaatio johtaa useiden signalointireittien muutoksiin. Aktivaation tarkoituksena on laukaista vaste kohdesolussa, jolloin solunulkoinen viesti kulkeutuu solunsisäisille viestinvälittäjille eli signaalimolekyyleille (Nataraja ym. 2015). Hormoni-reseptori-kompleksin muodostumisen myötä reseptorin konformaatio muuttuu. Tämän seurauksena syklistä adenosinimonofosfaattia (cAMP) aletaan tuottaa adenylaattisyklaasin (AC) avulla (Sunahara ym. 1996; Katritch ym. 2013). cAMP on solun yleinen toisiolähetti ja tärkeä signaalimolekyyli viestinvälitysketjuissa sekä muiden fysiologisten prosessien säätelyssä (Doherty ym. 2002). Adenylaattisyklaasin toiminta tehostuu, kun reseptorin konformaatiomuutoksesta aktivoituneet G-proteiinit edelleenaktivoivat uusia adenylaattisyklaasiproteiineja (Katritch ym. 2013). G-proteiinien dimerisaation myötä FSH-ligandin alayksiköt hajotetaan (Kleinau & Krause 2009). Tämän myötä hormonin  $\alpha_s$ -alayyksikkö stimuloi adenylaattisyklaasin toimintaa (Ulloa-Aguirre ym. 2007). Solunsisäisen cAMP-tason nousu johtaa ensisijaisesti proteiinikinaasi A:n aktivaatioon. PKA:n aktivaatiolla voidaan säädellä useiden geenien ilmentymistä transkriptiotekijöiden fosforylaation välityksellä (Nataraja ym. 2015). Syklisen AMP:n induktiosta johtuva PKA:n aktivaatio on yksi tärkeimmistä FSH:n vaikutusmekanismeista (Dias ym. 2002). cAMP-tasojen muutokset korreloivat GPCR-aktivaation kanssa, jolloin cAMP-tasoja tarkastelemalla voidaan tehdä johtopäätelmiä reseptorin toiminnasta *in vitro* (Trehan ym. 2014). Takaisinsäätely toimii niin ikään toiseen suuntaan, jolloin reseptorin aktivaation myötä hormoniligandin alayksiköt alkavat värvätä GPCR-kinaaseja (GRK) defosforyloimaan reseptoreita (Ulloa-Aguirre ym. 2013). Tämä johtaa  $\beta$ -arrestiin sitomiseen reseptoriin, minkä johdosta reseptorien ekspressiotasot alkavat laskea (Tranchant ym. 2011).

FSHR-aktivaatio on edellytys FSH:n toiminnalle niin naisen kuin miehenkin lisääntymisjärjestelmässä (Ulloa-Aguirre ym. 2013). Kivesten Sertolin soluissa *FSHR*:n ilmentyminen tukee aineenvaihduntaa ja siittiösolujen tuotantoa eli spermatogeneesiä (Hermann ym. 2007). Munarauhasten granuloosasoluissa toiminnallinen FSH-reseptori on välttämättömyys paitsi somaattisten solujen normaalille kasvulle ja kehitykselle, myös munasolujen kypsymiselle follikulogeneesin myöhemmässä vaiheessa (Nataraja ym. 2015). Hormonin ja reseptorin vuorovaikutuksella on keskeinen rooli esipubertaalivaiheen munasarjan kehityksessä kypsäksi, syklisesti toimivaksi ja hormonaalisesti aktiiviseksi elimeksi (Gromoll & Simoni 2005). FSH:n merkitys gametogeneesin käynnistämisessä on kiisteltyä (Huhtaniemi & Aittomäki 1998; Hermann ym. 2007), mutta etenkin naisilla munasarjojen myöhempi kehitys nojaa olennaisesti hormonin normaaliin toimintaan (Aittomäki ym. 1995; Dias ym. 2010). Miehen lisääntymiskyvylle FSH näyttäisi olevan vähemmän merkityksellinen, esimerkiksi miesten *FSHR*-mutaatiot ilmenevät yleensä lievemmällä fenotyypillä (Themmen & Huhtaniemi 2000). Naisilla fertiliteettiä alentava vaikutus on korostuneempi muun

muassa siksi, että miesten elimistössä muut signaalintireitit voivat kompensoida perinteisen cAMP/PKA-signaalinvälityksen puutteellisuutta (Tranchant ym. 2011).

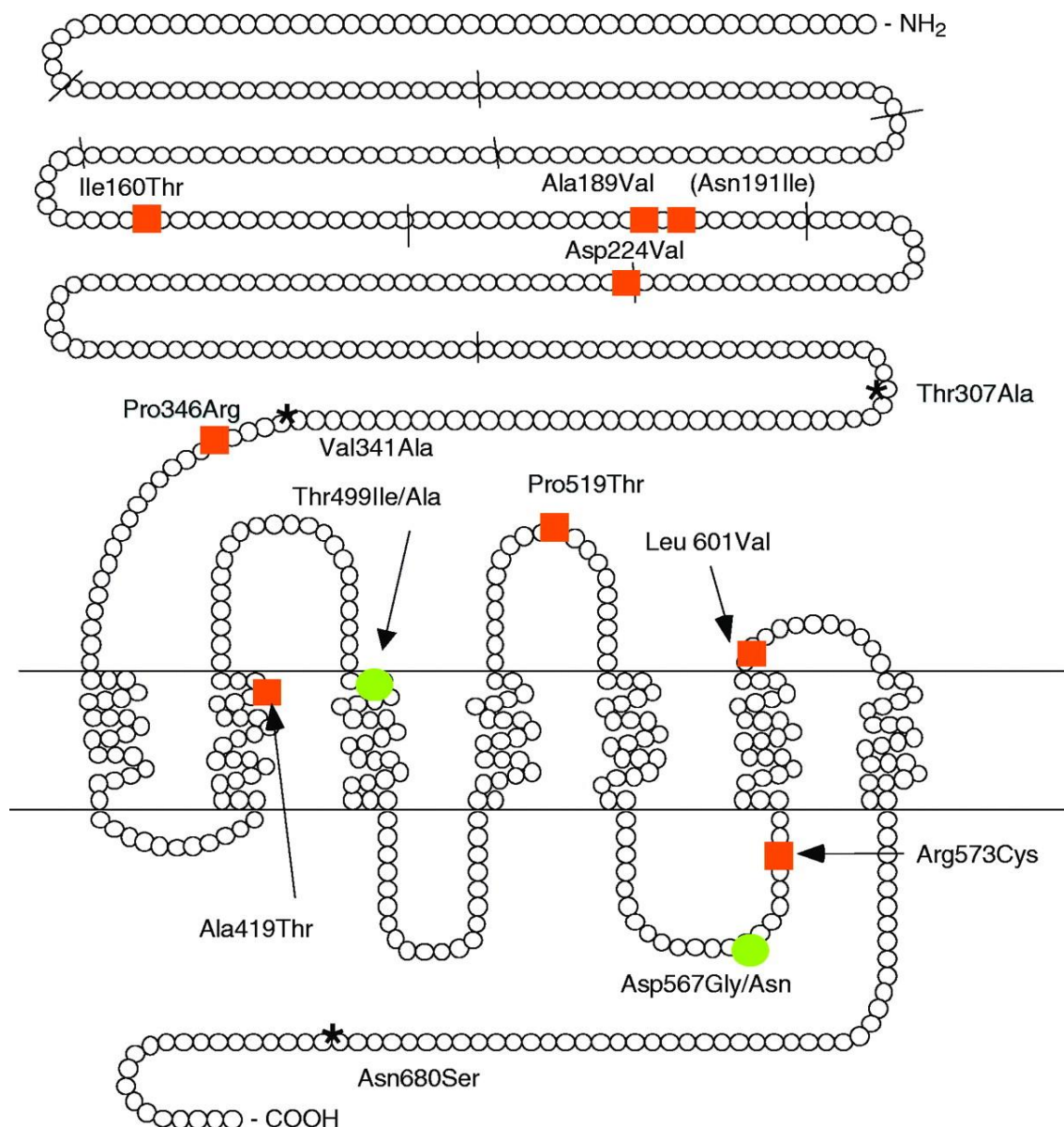
### ***FSHR*-mutaatiot**

Follikkeliä stimuloivan hormonin biologinen merkitys lisääntymisjärjestelmälle konkretisoituu FSH-reseptoriin liittyvien mutaatioiden aiheuttamien häiriöiden kautta. FSH:n toiminta pohjaa sen sitoutumiseen reseptoriinsa, jonka aktivoitumiseen viestinvälitys perustuu. Hormonia on veressä normaalisti vain pieninä pitoisuuksina, joten kinetiikan tulee olla tehokas ligandin ja reseptorin interaktiossa (Dias ym. 2010). Muiden GPCR:ien tapaan vastasyntetisoitu FSHR laskostetaan normaalisti translaation päätteeksi oikeaan, funktionaaliseen muotoonsa ja ohjataan solukalvolle sitomaan oikeita ligandeja (Ulloa-Aguirre ym. 2013). Jos esimerkiksi mutaation johdosta reseptoriproteiini laskostuu virheellisesti ja/tai reseptorin kuljetus solulimakalvostosta kohti solukalvoa vaikeutuu, hormonin sitominen jää puutteelliseksi tai estyy kokonaan.

Kuten lukuisten perinnöllisten mutaatioiden, FSH-reseptorin geneettisten anomalioiden taustalla on väestön geografiseen jakautumiseen pohjaava perustajanvaikutus (Rannikko ym. 2002). Tällöin mutaatioiden esiintyvyys on verisukulaisuudesta johtuen epätasainen suhteutettuna väestötiheyteen (Aittomäki ym. 1995). Eräs suomalaissuvuissa verrattain yleinen, FSH-reseptorin inaktivoiva pistemutaatio (566C→T) aiheuttaa Ala189Val-transition eli aminohappoketjun muutoksen, jossa alaniini korvautuu valiinilla (Aittomäki ym. 1996). Mutaatio periytyy resessiivisesti autosomeissa (Gromoll ym. 1996; Beau ym. 1998). Ala189Val-transitioita esiintyy lisäksi sporadisesti (*de novo*), jolloin yksilön suvussa ei tavata ennestään samaa mutaatiotyyppiä (Aittomäki ym. 1995).

Munasarjojen rakenteelliset ja toiminnalliset häiriöt ovat yleisiä *FSHR*-mutaatiosta aiheutuvia oireita (Doherty ym. 2002). Homotsygoottisena Ala189Val-mutaatio aiheuttaa primaarista hypergonadotrooppista amenorreaa ja eriasteisia munarakkuloiden kehityksen häiriöitä naisilla sekä spermatogeneesin häiriöitä miehillä (Tapanainen ym. 1998). Naisten oirekuvaa luonnehtivat poikkeuksellinen pubertaalikehitys sekä anovulaation ja munasarjojen gonadotropiiniresistenssin kautta ilmenevä hedelmättömyys (Aittomäki ym. 1996). Seerumin LH- ja FSH-tasot ovat pysyvästi korkeita, sillä signaalintiketju ei etene solun sisälle (Doherty ym. 2002), ja täten normaali, inhiboiva takaisinkytkentä puuttuu. Homotsygooteilla naisilla munarakkuloiden kehitys pysähtyy, ja granuloosasoluissa alkaa esiintyä laajaa apoptoosia, mikä edelleen vaikeuttaa tilannetta (Lussiana ym. 2008). Aromataasien toiminta munarauhasissa on marginaalista, jolloin munarakkuloissa ei esiinny juurikaan estrogeenia (Vaskivuo ym. 2002). Myöskään eksogeeninen FSH-annostelu ei tuota haluttua vaikutusta munasarjojen steroidituotannolle. Heterotsygooteilla naisilla esiintyy usein sekundaarista amenorreaa. Tällöin FSH-reseptorin toiminta on yleensä alentunut, mutta munarakkuloiden määrä on normaali (Touraine ym. 1999). Miehillä kyseinen Ala189Val-mutaatiosta johtuva reseptorin

inaktivaatio on erittäin harvinainen ja aiheuttaa lievemmän fenotyypin. Tällöin vaikutus fertiliteettiin on yleensä vähäinen tai vaihteleva (Tapanainen ym. 1997). Naisten tavoin seerumin FSH-tasot ovat korkeat. Siemennesteessä esiintyy jonkin verran poikkeavuutta, minkä ohella usein kivekset jäävät kooltaan pienemmiksi. Toisin kuin naisilla, miehillä *FSHR*-genotyyppi ja FSH-signaaloinnin toimimattomuus ei ole vielä väistämättä ennuste hedelmättömyydestä. Myös sekundaarista hypogonadismia tavataan kyseistä mutaatiota kantavilla miehillä. Lisäksi tunnetaan tapauksia, joissa munasarjojen muodostumisen häiriöstä kärsivien naisten veljillä esiintyy sukurauhasten muodostumisen poikkeamia (Aittomäki ym. 1995).



**Kuva 2.** FSH-reseptorin rakenne ja yleisimpien *FSHR*-mutaatioiden sijainti aminohappoketjussa. Inaktivoiva Ala189Val-mutaatio kuvattuna spesifisessä kohdassa aminohappoketjua reseptorin solunulkoisessa domeenissa (ECD). Mutaation johdosta signaalinvälitys vaurioituu joko viallisen kalvoreseptorin vuoksi tai vaihtoehtoisesti proteiini saattaa jäädä jumiin solulimaan. Kuva julkaisusta Themmen 2005.

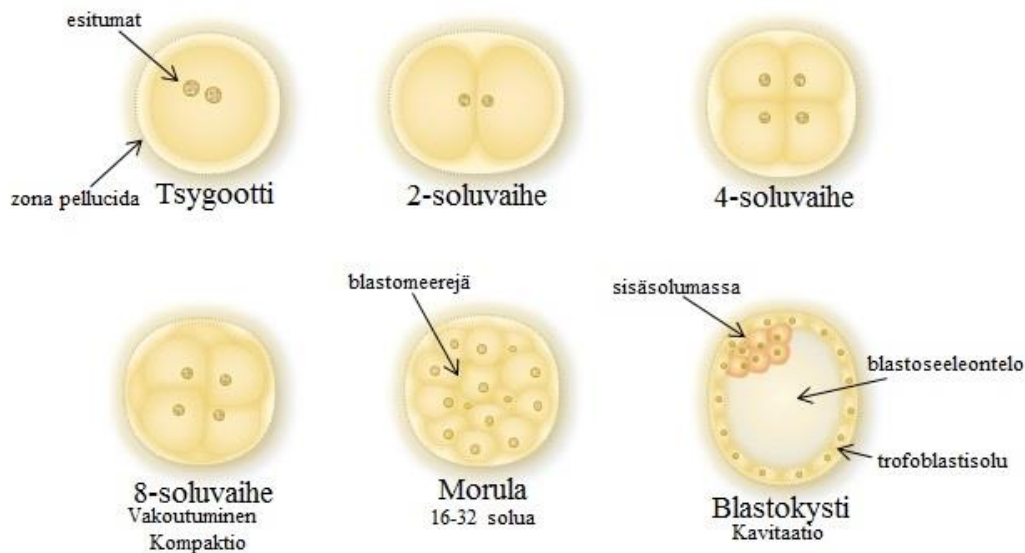
Ala189Val-mutaatio [Kuva 2] on kohdistunut reseptorin solunulkoiseen domeeniin (Rannikko ym. 2002). Yleisesti reseptorien ECD-mutaatiot johtavat häiriöön proteiinin kuljetuksessa (Doherty ym. 2002). Tässä alaniinin korvautuminen valiinilla johtaa reseptorin konformaatiomuutokseen, mikä heikentää mutatoituneen reseptorin kohdentamista solukalvolle. Tämä voi tapahtua itsenäisesti tai johtua virheellisestä laskostumisesta: mutaatio nimittäin näyttäisi vaurioittavan vastasyntetisoidun FSHR-proteiinin laskostumista eli toimenpidettä, jolla on kriittinen merkitys proteiinin kolmiulotteisen rakenteen kautta sen toiminnallisuudelle (Rannikko ym. 2002). Lopputulos on sama: proteiinin kuljetuksessa esiintyy Ala189Val-mutaation johdosta häiriöitä, jolloin reseptoriproteiini ei päädy oikealle paikalleen solukalvolle. Reseptoreita ei esiinny solukalvolla tällöin lainkaan tai riittävästi. Vaihtoehtoisesti laskostumisen ongelmista johtuen reseptorit ovat toimintakyvyttömiä, eli ne eivät kykene toisilähetin aktivoimista edellyttävään viestinvälitykseen (Aittomäki ym. 1995). Toisinaan inaktivoivasta mutaatiosta huolimatta osa reseptorin toimintakapasiteetista säilyy vähintäänkin marginaalisella tasolla. Puhutaan siis residuaaliaktiiviteetista (Huhtaniemi & Aittomäki 1998). Tutkimuksissa onkin todettu, että Ala189Val-mutaatio laskee reseptorin toimintakykyä merkittävästi, mutta ei aina estä sitä kokonaan (Aittomäki ym. 1995). Esimerkiksi vähäisenä esiintyvät reseptorit saattavat mutaatiosta huolimatta ilmentää normaalia sitomisherkkyyttä. Residuaaliaktiiviteetin on arveltu perustuvan G-proteiineista riippumattomaan signaalointiin esimerkiksi mitogeeniaktivoituvien proteiinikinaasien (MAPK/ERK) välityksellä (Tranchant ym. 2011). Solu näyttäisi aktivoivan muita signaalointireittejä erityisesti, kun FSH-reseptorien määrä on alentunut solukalvolla. Reseptorien kapasiteettierojen on tulkittu selittävän kliinisellä tasolla potilaiden erilaisia oireyhtymän ilmenemismuotoja (Rannikko ym. 2002).

FSH-reseptorin toiminnallisuus vaikuttaisi olevan erityisen herkkä primaarisekvenssin mutaatioille (Ulloa-Aguirre ym. 2013). Siinä missä *LHR*:n mutaatioita tunnetaan lukuisia erilaisia, toistaiseksi tunnetut *FSHR*-mutaatiot ovat paitsi harvinaisia myös harvalukuisia (Doherty ym. 2002). Mutaation sijainnilla ja fenotyypillä on korrelaatio; mutaation vaikutusten kannalta näyttäisi olevan ratkaisevaa, mihin kohtaan aminohappoketjua mutaatio kohdistuu, eikä niinkään millaisia aminohappo-substituutioita mutaatio aiheuttaa.

## **Alkion varhaiskehitys ja kehityslinjan määräytyminen**

Alkuvaiheen ihmisalkiota reunustavan pintakerroksen erilaistuminen trofoblastiksi ja ennen pitkää osaksi toiminnallista istukkaa on välttämättömyys onnistuneelle raskaudelle, alkion kasvulle ja selviytymiselle (Giakoumopoulos & Golos 2013). Merkittävintä tässä on varhainen ohjelmoituminen oikealle kehityslinjalle eli määräytyminen (Golos ym. 2013). Määräytymisen myötä solujen morfologia ja ominaisuudet alkavat asteittain muuttua kyseiselle erilaistuneelle solutyypille ominaiseen suuntaan.

Munasolun hedelmöityttyä tsygootti alkaa kasvattaa solumääräänsä [Kuva 3]. Alkion varhaisimmat solut, blastomeerit alkavat vähitellen jakautua karkeasti kahteen eri solupopulaatioon, jolloin ulkopuolelle vaeltavat solut alkavat kehystää sisäpuolelle jäävää alkiota (Gilbert 2013). Sisäsolumassan ja ulkosolukerroksen eriytyminen on ensimmäinen määrätymistapahtuma nisäkkään alkionkehityksessä (Hemberger ym. 2010; Yoyooka ym. 2016). Riippuen solujen sijainnista, erilaistuminen käynnistyy kahteen suuntaan: ulkosolut määrättyvät näin eri linjalle kuin sisäpuolen solut, joista kehittyy primitiivinen endodermi sekä epiblasti eli alkiolevy (Sariola ym. 2015). Osa primitiivisestä endodermista ja epiblastista muodostaa lisäksi alkionulkoisia kudoksia (Roberts ym. 2004). Epiblasti puolestaan muodostaa lopulta varsinaisen alkion, jolle ulkokerroksen solut toimittavat ravintoa (Steinberg & Robins 2016).



**Kuva 3.** Alkionkehityksen varhaisvaiheet. Hedelmöittynyt munasolu jakautuu vakoutumalla zona pellucidan sisällä ensin kaksisoluseksi, nelisoluseksi ja niin edelleen. Kompaktion myötä muodostunut morula koostuu blastomeereistä. Tämän jälkeen sisäsolumassa ja ulkosolukerros alkavat eriytyä. Ulkosolut erilaistuvat trofoblastisoluiksi. Sisäsolumassasta muodostuu valtaosin alkionlinjan rakenteita, mutta osa siitä osallistuu alkionulkoisten kudosten, kuten sikiökalvojen muodostumiseen. Alkion sisälle muodostuvan blastoseeleontelon eli nesterakkulan syntymisen myötä alkioita aletaan kutsua blastokystiksi; alkiorakkulaksi.

Alkuun vain yhdestä kerroksesta koostuvan ulkokerroksen soluja nimitetään trofoblastisoluiksi (Yoyooka ym. 2016). Yksittäiset trofoblastisolut muodostavat trofektodermin; kerroksen, joka reunustaa blastokystiä. Tämä varhainen rakenne on yhteinen kantamuoto kaikille istukkaepiteelin erilaisille trofoblastisolupopulaatioille (Cross 2000; Roberts ym. 2004). Trofoblastikudos on varsinaisten tehtäviensä ohella suoraan merkityksellinen alkion kaavoittumiselle ja elinkyvyille: se osallistuu nimittäin epiblastin signaalointiin ja alku-uurteen muodostumiseen (Beddington & Robertson 1999). Implantaation eli kohtuun kiinnittymisen jälkeen trofoblastista erilaistuva

alkionulkoinen ektodermi yhtyy epiblastiperäisen alkionulkoisen mesodermin kanssa, alkaen muodostaa muun muassa sikiökalvojen rakenteita (Rossant 1995; Drukker ym. 2012). Samalla blastokystin ulkopuolista kerrosta aletaan nimittää yleisesti trofoblastiksi. Lopulta trofoblasti eli istukan epiteelikerros koostuu erilaisista erilaistuneista soluista, jotka samasta alkuperästään huolimatta eroavat toisistaan morfologialtaan ja toiminnoiltaan (Douglas ym. 2009).

Alkion kahden varhaisimman solulinjan eriytymisen yksityiskohdat ovat vielä osittain hämärän peitossa. Määräytymiseen tiedetään liittyvän erilaisia solunsisäisiä signaaloinnin muutoksia, kuten transkriptiotekijöiden aktiivisuuden muutoksia (Roper & Hemberger 2009). Kehityksen kulun perusta on varsinaisessa perintöaineksessa, mutta geenien luennan ja kromatiinin tilan epigeneettisellä säätelyllä on erityinen merkitys esimerkiksi pintakerroksen eriytymiseen sisäsolumassasta ja myöhemmin erilaisten trofoblastin solupopulaatioiden erilaistumiseen (Ng ym. 2008; Pfeffer & Pearton 2012; Sarkar ym. 2016). Hypoksia eli hapen niukkuus näyttäisi liittyvän olennaisesti niin epiblastin kuin trofoblastinkin muodostumiseen (Saito & Nakashima 2014). Tutkitusti myös tietyt miRNA:t toimivat RNA-interferenssin kautta alkion transkriptomia hiljentäen ja vastaavasti trofoblastia aktivoiden (Aagaard ym. 2016). Tällä on vaikutuksensa trofoblastin linjautumiseen ja näiden solujen erilaistumiseen (Lee ym. 2016). Tarkat molekulaariset totipotentin eli kaikkikykuisen alkion soluallokointiin liittyvät mekanismit ovat edelleen tuntemattomia (Wu ym. 2008).

Määräytymistä seuraa asteittainen soluerilaistuminen (Golos ym. 2013). Erilaistuminen tapahtuu alkionkehityksen myötä ympäristöstä tulevien signaalien, alkion geenien, näihin vaikuttavien transkriptiotekijöiden ja solujen välittämien viestimolekyylien tiiviissä vuorovaikutuksessa (Liu ym. 2016). Kuten kaikkien kudosten ja elinten kehitys, plasentaatio eli istukan muotoutuminen perustuu erilaistumisen ja kasvun ohella kaavoittumiseen. Istukan morfogeneesi on raskauden varhaisin tapahtuma ja sitä ohjaavat kaavoittumisen lisäksi solujen induktiiviset vuorovaikutukset (Giakoumopoulos & Golos 2013). Plasentaatio käynnistyy välittömästi blastokystin kiinnittyttyä kohdun limakalvoon ja siihen liittyvät oleellisesti proliferaatio eli solujen jakautuminen sekä apoptoottinen solukuolema.

### **Signalointi: tärkeimmät trofoblastin erilaistumiseen vaikuttavat molekyylit**

Trofoblastin erilaistumiseen vaikuttaa suuri joukko signaalimolekyyliä, kuten kasvu- ja transkriptiotekijöitä. Signaaloinnin muutokset laukaisevat vaikutuksia geenien ilmentymisessä, mikä puolestaan saa aikaan määräytymisen tietyille solulinjalle. Pluripotenttien kantasolujen soluviljelyssä pyritään yleensä mukailemaan ja jäljittelemään *in vivo* alkionkehitystä, jolloin toivotun kudoksen erilaistumiseen vaikuttavia kasvutekijöitä voidaan lisätä ravinneliuokseen ja näin ohjata

erilaistumista haluttuun suuntaan (Das ym. 2007). Erityisen olennaista ihmisalkion erilaistumissuunnan valikoitumiselle näyttäisi olevan mihin muihin viestimolekyyleihin eräs tärkeimmistä kasvutekijöistä, BMP, yhdistetään (Sudheer ym. 2012).

### **BMP:t**

Luun morfogeeniset proteiinit eli BMP:t kuuluvat TFG- $\beta$ -superperheeseen (Zhang ym. 2008). Tämä superperhe koostuu yli 40 erilaisesta kasvutekijästä, joista osa vaikuttaisi säätelevän myös trofoblastin erilaistumista (Ji ym. 2013). Kantasolututkimuksissa on havaittu yhteys luun morfogeenisten proteiinien ja alkion varhaisrakenteiden erilaistumisen välillä (Amita ym. 2013; Golos ym. 2013; Li ym. 2013). Kyseessä on monipuolinen ryhmä kasvutekijöitä, joissa usein konsentraatiogradientti ja induktion kesto vaikuttavat suuresti tavoitekudoksen erilaistumiseen ja kehityskulkuun. Konsentraatiogradientilla eli vasteen annosriippuvaisuudella tarkoitetaan, että saman kasvutekijän lisääminen eri pitoisuuksilla johtaa eri lopputuloksiin. Induktion kestolla on puolestaan merkitystä kehityslinjan määräytymiseen ja solujen erilaistumiseen, sillä esimerkiksi lyhyt- ja pitkäkestoinen BMP-käsittely vaikuttaa eri tavalla (Zhang ym. 2008).

BMP4-proteiini on *BMP4*-geenin koodaama kasvutekijä. Pitkäkestoinen BMP4-induktio vaikuttaa johtavan ensisijaisesti trofoblastin ja alkionulkoisen endodermin erilaistumiseen (Zhang ym. 2008; Vallier ym. 2009). Lyhytkestoinen BMP4-käsittely puolestaan näyttäisi aikaansaavan ensisijaisesti mesodermin erilaistumista, mutta tutkimusten mukaan mesodermin erilaistuminen edellyttää lisäksi endogeenista FGF-, TGF- $\beta$ - ja/tai Aktiviini/Nodal -signaaliaktiivisuutta. BMP4:n on havaittu johtavan erilaistumista trofoblastisuuntaan tehokkaammin kuin muiden samankaltaisten ligandien (Xu ym. 2002). BMP2:n ja BMP7:n on todettu kykenevän indusoimaan myös trofoblastia, minkä ohella ne vaikuttaisivat säätelevän muidenkin alkionulkoisten, ei-trofoblastiperäisten linjojen erilaistumista sekä alkiolinjaan kuuluvan mesoderminkin kaavoittumista (Mae ym. 2013; Pera ym. 2004; Solloway & Robertson 1999). Mesodermin erilaistuminen voi johtua suoraan BMP4:n vaikutuksesta alku-uurteen muodostumiseen (Yu ym. 2011). BMP4:n erilaistamispotentiaalin onkin esitetty olevan kaksisuuntainen (Gerami-Naini ym. 2004). BMP4:n kyky aktivoida trofoblastin kaavoittumista ja johtaa trofoblastille tyypillisten merkkigeenien ilmentymiseen on sittemmin havaittu useammissa tutkimuksissa (Chen ym. 2013a; Drukker ym. 2012; Li ym. 2013).

### **FGF:t**

Ihmisen varhaiskehityksessä fibroblastikasvutekijät eli FGF:t osallistuvat mesodermin kaavoittumiseen (Ciruna & Rossant 2001). Niin *in vitro* epiblastin, trofoblastin kuin primitiivisen endoderminkin määräytyminen nojaa fibroblastikasvutekijöiden signaaliin (Sudheer ym. 2012). Etenkin BMP-käsitellyissä soluviljelmissä erilaistumissuunta näyttäisi riippuvan olennaisesti juuri FGF-signaalinnista (Yu ym. 2011), jolloin FGF:n aktivoinnilla tai hiljentämisellä voidaan tarkkaan

vaikuttaa lopputulokseen (Sudheer ym. 2012). FGF yhdistettynä BMP-signaalointiin vaikuttaisi indusoivan pluripotenttien kantasolujen erilaistumista mesendodermin eli epiblastin mesodermin ja endodermin yhteisen kantamuodon soluiksi, mikä on todettu *BRACHYURY*:n ja muiden alku-uurteen merkkigeenien ilmentymisen avulla (Yu ym. 2011). FGF:t liittyvät samaten pluripotenttien kantasolujen ylläpitämiseen erilaistumattomassa, proliferoivassa tilassa (Xu ym. 2005). FGF:n uusiutumispotentiaalin ja solujen pluripotenssin ylläpito pohjaa muun muassa endogeenista BMP-signaalointia inhiboivaan vaikutukseen sekä MAPK/ERK-signaalinvälitysketjun välityksellä pluripotenssimerkkigeenien, kuten *OCT4*, ilmentymisen säätelyyn (Yu ym. 2011; Sudheer ym. 2012).

Pluripotentteissa kantasoluissa esiintyy luontaisesti endogeenista FGF-signaalointia. On havaittu, että solut erilaistuvat BMP4-induktiolla trofoblastin suuntaan erityisesti, kun bFGF-signaalointi on samaan aikaan inhiboitu (Xu ym. 2002). FGF-signaalointi ei suoraan estä trofoblastin erilaistumista, mutta hidastaa sitä huomattavasti (Das ym. 2007). FGF:t toimivat aktivoimalla solupinnan reseptorityroosiinikinaaseja (Skaper ym. 2000), minkä johdosta FGF-signaalointi saadaan estettyä käyttämällä PD173074-reseptoriantagonistia (Yu ym. 2011). Käsittelyn teho perustuu kasvutekijöiden reseptoreiden tyroosiinikinaasien salpaamiseen, jolloin normaali fosforylaatioreaktio ja sen myötä signaalinvälitys estyy (Kunath ym. 2007). Alku-uurteen välttämiseksi ja trofoblastisuunnan mahdollistamiseksi FGF-signaloinnin estäminen on siis tarkoituksenmukaista.

### **Muut kasvutekijät**

Luun morfogeenisten kasvutekijöiden tavoin Aktiviini ja Nodal kuuluvat TGF- $\beta$ -kasvutekijöiden superperheeseen. Yhdessä FGF-kasvutekijöiden kanssa Aktiviini/Nodal-signaalointi tukee selkäjänteisalkion alku-uurteen ja mesendodermin muodostumista (Sudheer ym. 2012). FGF:n tavoin Aktiviini/Nodal-induktio vaikuttaa olennaisesti solulinjan määräytymiseen ja solujen uusiutumiskykyyn säätelemällä esimerkiksi pluripotenssitekijöiden geeniluentaa (Wu ym. 2008; Brown ym. 2011). Aktiivinisigaloinnin estäminen näyttää vastaavasti johtavan pluripotenssin laskuun. Tämä on havaittu sekä pluripotenssin merkkigeenien vaimennussäätelynä että morfologisina muutoksina.

*In vitro* Aktiviini/Nodal-induktion estäminen näyttäisi johtavan myös trofoblastin erilaistumiseen, sillä sen inhibition on todettu lisäävän *BMP*-geenien ilmentymistä ja aktivoivan BMP-signaalointia (Wu ym. 2008). Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että Aktiviinit ja BMP:t kilpailevat osittain samoista signaalimolekyyleistä. Erityisen korostunutta trofoblastin muodostuminen on, kun Aktiviini-sigaloinnin estäminen (A83-01-inhibiittori) yhdistetään BMP-signaalointiin ja FGF-inhibitioon (Amita ym. 2013). Tällöin minimoidaan Aktiviinin ja BMP:n kilpailu signaalimolekyyleistä sekä lisäksi endogeenisen FGF-sigaloinnin että Aktiviinin pluripotenssia, erilaistumatonta tilaa ylläpitävä vaikutus (Wu ym. 2008). Ihmisen ohella esimerkiksi hiirellä Nodal



on merkityksellinen kehityksen säätelijä, joka vaikuttaa tasapainoon trofoblastin erilaistumattomuuden ja erilaistumisen välillä (Roberts & Fisher 2011).

### **Tärkeimmät transkriptiotekijät**

Muun muassa solun ulkopuoliset signaalit, kuten kasvutekijät, säätelevät transkriptiotekijöiden ilmentymistä. Transkriptiotekijät ovat proteiineja, jotka ohjaavat geenien luentaa sitoutumalla joko suoraan tavoitegeenin promoottori- tai tehostaja-alueelle tai vaikuttamalla toisiin transkriptiotekijöihin, jolloin ne voivat muodostaa suuria proteiinikomplekseja (Sariola ym. 2015). Transkriptiotekijät voivat toimia käynnistämällä (aktivaattorit) tai hiljentämällä (repressorit) geenien lukemisen. Yleensä transkriptiotekijän sitoutuminen edellyttää kromatiinirakenteen muutoksia.

*BRACHYURY* (*BRA*, tunnetaan myös nimellä *T*) on alku-uurteen ja mesendodermisolujen (Kispert & Herrmann 1994) ohella alkionulkoisen ekto- ja mesodermin solujen merkkigeeni (Rivera-Pérez & Magnuson 2005; Inman & Downs 2006). Ainakin hiirellä *BRA*-ekspressio edeltää ja on välttämätön *CDX2*:n ilmentymiselle (Vallier 2009; Bernardo ym. 2011). Kummatkin näistä geneista ovat olennaisia niin mesodermin kuin trofoblastinkin muodostumisessa. *BRA* osallistuu sikiökalvojen kehitykseen (Drukker ym. 2012) ja sitä ekspressoidaan trofoblastista peräisin olevan korionisen ektodermin kantamuodossa (Inman & Downs 2006). Trofoblasti osallistuu niin ikään alkion signalointiin ja alku-uurteen muodostumiseen gastruloivassa blastokystissä, kun trofoblastista erilaistuva alkionulkoinen ektodermi tuottaa yleissignaaleita, jotka vaikuttavat alkion aksiaaliseen kaavoittumiseen (Beddington & Robertson 1999; Lu ym. 2001; Wu ym. 2008). Tämä signalointi edistää mesodermille tyypillisten geenien ilmentymistä, esimerkiksi juuri *BRA* (Lu ym. 2001).

*CDX2* eli kaudaalinen transkriptiotekijä II on aktiivinen mesodermin ja hermostoputken lisäksi trofoblastisoluissa, minkä ohella sillä on olennainen vaikutus gastrulaatiovaiheessa alkion kaavoittumiselle (Chawengsaksophak 2004). Sen on todettu olevan hiirellä tärkein trofoblastin erilaistumisen säätelijä (Yoyooka 2016), ohjaten preimplantaatiovaiheessa trofoblastilinjan määräytymistä ja proliferaatiota (Giakoumopoulos & Golos 2013). Ihmisellä *CDX2*:n on havaittu ilmentyvän trofektodermissä niin RNA- kuin proteiinitasollakin (Adjaye ym. 2005; Niakan & Eggan 2013), mutta on arveltu, että ihmisellä *CDX2* ei olisi yhtä merkittävässä osassa trofoblastin säätelyssä (Douglas ym. 2009). Mesodermiinkin viittaavana merkkigeeninä se ei ole tyypillinen ainoastaan trofoblastille (Ralston & Rossant 2008).

GATA-perheen sinkkisormitranskriptiotekijöillä on tärkeä asema useiden kudosten varhaiskehityksessä ja erilaistumisessa (Koutsourakis ym. 1999). GATA2- ja GATA3-transkriptiotekijöiden on esitetty olevan trofoblastiin liitettyjen geenien ekspression ja istukan funktionaalisuuden tärkeitä säätelijöitä *in vivo* (Ma ym. 1997; El-Hashash ym. 2010). *GATA3* säätelee

trofoblastin erilaistumista riippumatta *CDX2*:sta (Giakoumopoulos & Golos 2013). Tuoreen julkaisun mukaan *GATA3*:a voidaan pitää trofoblastin merkkigeeninä (Lee ym. 2016). *GATA*-transkriptiotekijöillä näyttää olevan yhteys myös istukan myöhempään kehitykseen, minkä ohella ne vaikuttavat alkionlinjan kehitykseen (Ma ym. 1997). *GATA6* on varhaisen alkionulkoisen endodermin transkriptiotekijä, jolla saattaa olla vaikutusta esimerkiksi pluripotenssin säätelyyn (Zhang ym. 2008; Sariola ym. 2015). *GATA6* ohjaa blastokystivaiheessa primitiivisen endodermin ja epiblastin kehitystä, minkä lisäksi sen on arveltu ilmentyvän vähäisiä määriä trofektodermissäkin (Koutsourakis ym. 1999). Primitiivinen endodermi eroaa alkionkehityksessä lopulta muusta sisäsolumassasta (Roberts ym. 2004). Istukan muodostumisen myötä osa primitiivisestä endodermistä kontribuoi yhdessä epiblastista erilaistuneen alkionulkoisen mesodermin kanssa sikiökalvoihin. *GATA6* ei ole kuitenkaan ainoastaan alkionulkoisten rakenteiden merkkigeeni, vaan sitä ilmentetään myöhemmin lisäksi erilaisissa meso- ja endodermin solutyypeissä.

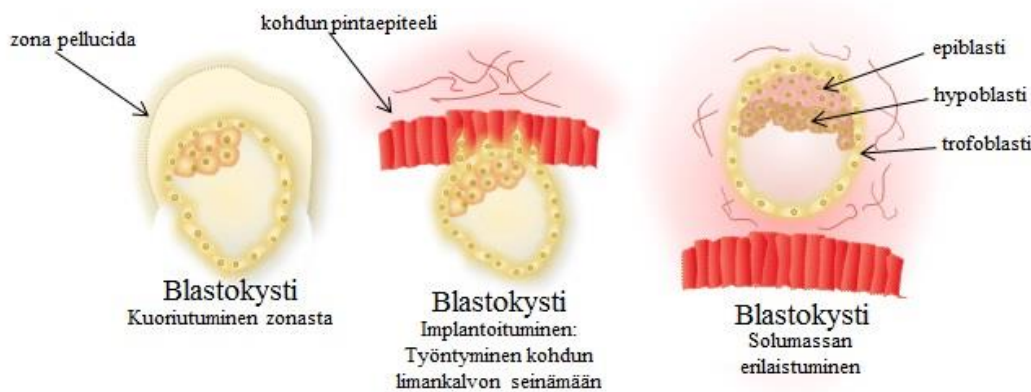
*HAND1* eli sydämen ja hermostopienan johdoksissa ekspressoituva proteiini 1 näyttäisi säätelevän ainakin hiirellä trofoblastin ja muiden alkionulkoisten rakenteiden erilaistumista (El-Hashash ym. 2010; Giakoumopoulos & Golos 2013). Geenillä on arveltu olevan merkitystä myös ihmisellä sikiökalvojen ja preimplantaatiovaiheen trofoblastin muodostumisessa (Knöfler ym. 2002). *In vitro HAND1*:n on havaittu ilmentyvän trofektodermissä niin RNA- kuin proteiinitasollakin. *HAND1* liittyy trofoblastin ohella mesodermin ja hermostopienan kaavoittumiseen (Barnes ym. 2010).

*OCT4* eli POU-domeenin luokan 5 transkriptiotekijä 1 (*POU5F1*) on tärkeä pluripotenssin merkkigeeni ja transkriptiotekijä pluripotentteissa kantasoluissa (Li ym. 2012). *OCT4*:lla on todettu olevan pluripotenssin säätelyn kautta suuri vaikutus eri linjojen määräytymiselle (Yu ym. 2011; Golos ym. 2013). Sen korkeat ekspressiotasot estävät tehokkaasti trofoblastin erilaistumista (Shi & Jin 2010). Vastaavasti sen laskun on todettu johtavan trofektodermin erilaistumiseen, jolloin soluviljelyssä *OCT4*:n induktiolla voidaankin säädellä erilaistumista (Roper & Hemberger 2009). Osa trofoblastitutkimuksista nojaa trofoblastin indusoimiseen yksinomaan *OCT4*:n inaktivaatiolla (Sudheer ym. 2012). Ihmisen blastokystissä *OCT4*-geeniä ilmentyy trofoblastissa, joskin matalammalla tasolla kuin sisäsolumassan puolella (Douglas ym. 2009). *In vitro OCT4*-ekspressio ei välttämättä katoa heti erilaistumisen myötä, vaan lasku tapahtuu asteittain.

## **Trofoblastin erilaistuminen**

Istukan soluista valtaosa on peräisin trofoblastista (Pfeffer & Pearton 2012). Sen rooli vasta-aineisiin perustuvassa immunologisessa puolustuksessa sekä kaasujen, ravinteiden ja jätteiden vaihdossa ja maternaalisten verisuonten muokkauksessa on välttämätön yksilönkehitykselle (Li ym. 2013). Lisäksi se tarjoaa fysiologista tukea kasvavalle ja kehittyvälle sikiölle sekä tuottaa hormoneja ja

sytokiineja, jotka äidin fysiologiaa muuttamalla ja uudelleenohjaamalla ylläpitävät raskautta (Das ym. 2007; El-Hashash ym. 2010; Sudheer ym. 2012). Olennaista on signaointi sikiön läsnäolosta ja vuoropuhelu maternaalisten kudosten kanssa (Giakoumopoulos & Golos 2013; Borbely ym. 2014).



**Kuva 4.** Implantaatio eli alkiorakkulan kiinnittyminen kohdun limakalvoon. Matkalla kohtuun zona pellucidan glykoproteiiniketto estää blastokystia kiinnittymästä munanjohtimen seinämään. Kohdussa alkiorakkula kuoriutuu zonasta trofoblastin tuottamien entsyymien avulla. Tällöin blastokysti pääsee kiinnittymään kohdun limakalvoon ja työntymään sen sisään. Implantaation yhteydessä trofoblastikerros alkaa jakautua kahteen kerrokseen. Sisäsolumassan puolella epiblasti ja hypoblasti alkavat eriytyä toisistaan.

Muodostaaksen yhteyden äidin kanssa blastokystin on kiinnityttävä kohtuun [Kuva 4]. Limakalvon epiteelikudoksen eroosio pohjaa trofoblastin tuottamiin proteolyttisiin entsyymeihin (Pansky 1982). Zona pellucidan eli glykoproteiiniketon surkastuessa blastokystin ympäriltä se pääsee kiinnittymään limakalvoon ja jatkamaan kasvuaan. Implantaatio käynnistyy alkiorakkulan kiinnittyessä endometriumiin, jolloin yksitumaisista soluista koostuva trofoblastikerros alkaa jakautua ja erilaistuminen kahteen kerrokseen alkaa (Huppertz ym. 2006). Blastoseeleä ja sisäsolumassaa jää ympäröimään sisemmäksi kerrokseksi erilaistuva sytotrofoblasti, jonka tärkein merkitys on alkion perusteellinen ankkurointi kohdun limakalvon seinämään. Sytotrofoblastin soluista muodostuu fuusioitumalla ulommaksi kerrokseksi synsytiotrofoblasti, jonka nukkalisäkkeet työntyvät kohtuun (Das ym. 2007). Synsytiotrofoblasti on vastuussa endokriinisestä hormonituotannosta: se tuottaa muun muassa progesteronia, estrogeenejä sekä istukkahormonia eli hCG:tä (John & Hemberger 2012). Kolmas erilaistuneen trofoblastin populaatioista, invasiivinen nukkalisäkkeiden ulkopuolinen trofoblasti vastaa ensisijaisesti maternaalisten kierrevaltimoiden uudelleenmuokkauksesta ja siten alkion kiinnittämisestä äidin kudoksiin. Tämä trofoblastityyppi tuottaa lisäksi HLA-G:tä (McMasters ym. 1995; Das ym. 2007; Amita ym. 2013; Telugu ym. 2013). HLA-G on raskaudenaikaiseen

immuunivasteeseen liittyvä antigeeni, jolla on maternaalisen immuunijärjestelmän uudelleenohjelmoimisen myötä tärkeä merkitys alkion ja äidin välisen rajapinnan ylläpitämisessä (Borbely ym. 2014).

Seurauksia trofoblastin puutteellisesta erilaistumisesta ovat erilaiset trofoblastiperäiset implantaation tai istukan toiminnan häiriöt (Ji ym. 2013; Shpiz ym. 2016). Nämä häiriöt voivat altistaa lapsettomuuden ohella raskauskomplikaatioille, kuten toistuville keskenmenoille, kohtukuolemalle, raskausmyrkytykselle tai ennenaikaiselle synnytykselle (Goldman-Wohl & Yagel 2002; Saito & Nakashima 2014). Epänormaalin kehityksen taustalla voivat piillä esimerkiksi apoptoosin ongelmat (Huppertz ym. 2006; Heazell & Crocker 2008) tai nukkalisäkkeen ulkopuolisen trofoblastin puutteellinen ankkuroituminen kohdun seinämään, jolloin implantaatio ei välttämättä onnistu (Dash ym. 2003).

Erilaistuminen trofoblastiksi on välttämätöntä istukan muodostumisen ja normaalin toiminnan kannalta ja siten ehto normaalille raskaudelle, mutta erilaistumisen tarkemmat mekanismit tunnetaan edelleen melko huonosti (Steinberg & Robins 2016). Trofoblastin tarkasta kehityskulusta ei ole yksimielisyyttä, ja istukallisten nisäkkäiden lajityypilliset erot vaikeuttavat tutkimusta (El-Hashash ym. 2010). Myöskään kunnollista *in vitro* -mallia ei ole ainakaan toistaiseksi olemassa. Ihmisen pluripotenttien kantasolujen on tutkimuksissa osoitettu kykenevän erilaistumaan lisäksi trofoblastin suuntaan, mutta malli on edelleen kiistanalainen (Bernardo ym. 2011; Li ym. 2013).

## **Kehityksen mallintaminen**

Implantaation jälkeisistä tapahtumista ihmisalkion varhaiskehityksessä ei tiedetä paljoakaan, sillä yksityiskohtainen tutkimus *in vivo* on haasteellista (John & Hemberger 2012). Varhaisraskauden aikaisia soluja on vaikea kerätä, ja näytteet ovat usein hyvin heterogeenisiä. Alkioita lahjoitetaan tutkimustarkoituksiin sangen vähän ja niiden käyttö on monissa maissa tarkoin säädeltyä, jopa kiellettyä kokonaan (Zdravkovic ym. 2015). Trofoblastin määrytymisen, erilaistumisen ja istukan morfogeneesin tarkasteluun onkin kehitetty korvaavia menetelmiä. Paljon arvokasta tietoa ja oivalluksia on saatu hiirimalleista. Ihmisen ja hiiren varhaisalkion kehitys poikkeaa kuitenkin monin tavoin niin rakenteellisesti kuin toiminnallisestikin (Wu ym. 2008). Istukka ja sikiökalvot kantamuotoineen ovat erilaisia, ja esimerkiksi kehityslinjojen määrytymisen säätely erilaisin signaalintimolekyylein tapahtuu eri tavalla. Ihmisen ja hiiren alkion kantasolut ylläpitävät myös pluripotenssia eri tavalla, minkä ohella näyttäisi siltä, ettei hiiren alkion kantasoluista muodostu lainkaan trofoblastikudosta ilman erillistä geneettistä manipulaatiota (Niwa ym. 2005; Tarkowski ym. 2010).

Eräs yleisimmistä varhaiskehityksen mallintajista *in vitro* ovat ihmisen alkion kantasolut (Horii ym. 2016; Lee ym. 2016). Niiden perusominaisuuksiin kuuluvat normaalin 46,XX-karyotyypin ohella korkea telomeraasiaktiivisuus ja tyypillisten kantasolujen pintamerkkigeenien ilmentäminen (Thomson ym. 1998). Tutkimusryhmässämme käytetään kaupallista H9-kantasolulinjaa, joka on eristetty 1990-luvulla hedelmöityshoidoissa ylimääräisiksi jääneistä luovutetuista alkioista (Thomson ym. 1998). Alkion kantasolut ovat uusiutumiskykyisiä soluja, jotka on eristetty varhaisalkion sisäsolumassasta blastokystivaiheessa (Li ym. 2012). Näille erilaistumattomille, kaikkien solujen kantamuodoille on luonteenomaista rajaton jakautuminen ja vakaa kehityspotentiaali alkiokerrosten ja ennen gastrulaatiota myös ulkosolukerroksesta erilaistuvan trofoblastin muodostamiseen (Xu ym. 2002). Tutkimusten mukaan alkion kantasolut kykenevät ainakin osittain jäljittelemään ihmisen embryogeneesiä (Zhang ym. 2008). Vaikka eivät vastaisikaan täysin homologisesti *in vivo* rakenteita, ne voivat silti mallintaa niin alkion sisäisten kuin alkion ulkopuolistenkin kudosten kehitystä (Giakoumopoulos & Golos 2013).

Alkion kantasolujen ohella trofoblastin erilaistumisen mallinnuksessa voidaan käyttää indusoituja pluripotentteja kantasoluja eli iPS-soluja (Shahbazi ym. 2016). Tyypillisesti aikuisen ihmisen kudoksesta peräisin olevia ei-pluripotentteja, somaattisia soluja voidaan tiettyjen geenien ilmentymistä indusoimalla palauttaa takaisin kehityspotentiaalinsa alkuun (Takahashi & Yamanaka 2006). Toisin sanoen aikuisen erilaistuneita soluja on mahdollista nykyisen molekyylibiologisen teknologian myötä ohjelmoida uudelleen pluripotenttiin kantamuotoon, jolloin solu voi jälleen erilaistua muodostamaan mitä tahansa elimistön kudoksia. Biolääketiedettä aikanaan ravistellut innovaatio pohjaa neljän varhaisalkionkehityksen olennaisimman transkriptiotekijän pakotettuun ekspressioon, mikä usein aikaansaadaan esimerkiksi retrovirusten tai toistuvien proteiinikäsittelyjen avulla. Indusoidut pluripotentit kantasolut ilmentävät samoja merkkigeenejä ja proteiineja kuin alkion kantasolut, minkä ohella niiden epigeneettiset ominaisuudet, solusykli ja erilaistumismahdollisuudet ovat vastaavanlaisia. iPS-solujen kehittämistä on pidetty tärkeänä saavutuksena, sillä soluilla on muun muassa monia potentiaalisia terapeuttisia käyttömahdollisuuksia, eikä niihin liity voimakkaita eettismoraalisia kysymyksiä, toisin kuin alkioeräisten solujen käyttöön (Wilson ym. 2015). Verrattuna alkion kantasoluihin iPS-soluja on helpompi tuottaa. Potilassolulinjoista peräisin olevia pluripotentteja soluja voidaan lisäksi käyttää mallintamaan erilaisia perinnöllisiä oireyhtymiä.

Yleisesti kummankin kantasolutyyppin oleellinen piirre on pluripotenssi eli kyky muodostaa kaikkia alkiolehtiin liittyviä solutyypppejä. Pluripotenttien kantasolujen etulyöntiasema verrattuna muihin yleisiin trofoblastin erilaistumisen mallinnuksessa käytettyihin soluihin (koriokarsinoomalinjat sekä trofoblastin primaarisoluviljelmät) näkyy erityisesti soluviljelyolosuhteissa ja kehityspotentiaalissa: kantasoluja voidaan esimerkiksi ylläpitää rajattomasti, toisin kuin vaikkapa primaarisia sytotrofoblastin soluja, jotka muuttuvat jakautumiskyvyttömiksi pian eristämisen jälkeen (Soncin ym.

2015; Shpiz ym. 2016). Koriokarsinoomalinjojen ja primaariviljelmien sytotrofoblastisolut ovat jo määräytyneet jollekin kehityslinjalle, joten niillä ei kantasolujen tavoin ole mahdollista tutkia solulinjojen määräytymiseen vaikuttavia tekijöitä. Kantasolut eivät myöskään kärsi mahdollisista transformaatioista kuten esimerkiksi koriokarsinoomalinjat (Schulz ym. 2008).

Pluripotentteja kantasoluja käytetään tänä päivänä mallintamaan muun muassa alkionulkoisten rakenteiden, kuten trofoblastin erilaistumista (Li ym. 2013; Roberts ym. 2014; Shahbazi ym. 2016; Koel ym. 2017). Erilaistamisen ”resepti” sen sijaan on hyvin kiistelty. Trofoblastin on havaittu erilaistuvan tehokkaimmin, kun solujen endogeenista BMP-signaalointia aktivoidaan BMP4-kasvutekijällä ja samaan aikaan inhiboidaan sekä FGF2- että Aktiviini A -viestinvälitysketjut (Yabe ym. 2016). Kasvutekijäyhdistelmästä on alettu käyttää nimitystä BAP-käsittely: BMP4 + A83-01 + PD173074. Kyseisen käsittelyn on lukuisissa tutkimuksissa vahvistettu johtavan *KRT7*- ja *CDX2*-positiivisiin soluihin (Amita ym. 2013) ja aikaansaavan muiden trofoblastille tyypillisten merkkigeenien ilmentymistä (Wu ym. 2008). Morfologisesti erilaistuminen on ilmennyt pluripotentteista soluista selkeästi poiketen trofoblastikudokselle tyypillisenä monitumaisena ja monikerroksisena, epiteelimäisenä fenotyyppinä, minkä ohessa soluilla on havaittu invaasiopotentiaalia (Yabe ym. 2016). Erilaistuneiden solujen on raportoitu ilmentävän trofoblastin immunohistokemiallisia ominaisuuksia sekä tuottavan muun muassa HLA-G:tä (Adachi ym. 2016), hCG:tä (Yabe ym. 2016) ja estradiolia (Chen ym. 2013a). Näitä tuloksia on käytetty vahvistamaan alkion kantasoluihin sovellettu BAP-käsittely trofoblastin syntymiseen ja erilaistumiseen johtavana menetelmänä. Useat tutkimukset ovat raportoineet, että samalla ei erilaistuisi muita, BMP4-induktioon liitettyjä soluja, kuten mesodermia, ektodermia tai primitiivisen endodermin soluja (Drukker ym. 2012). Vähintäänkin osa soluista vaikuttaisi todella erilaistuvan trofoblastin suuntaan, ja tutkimusten mukaan lopputuloksena syntyvä trofoblasti ei olisi muiden rakenteiden kuten esimerkiksi mesodermin jäänne (Sudheer ym. 2012; Amita ym. 2013; Yabe ym. 2016).

## **Pluripotenttien solujen erilaistaminen ja protokollien valinta**

Kuten todettua, tutkimusryhmämme Sertoli-projektia varten kehitetyn protokollan tuottama korkea *FSHR*-ekspressio johti miettimään vaihtoehtoisia syitä signaalin ilmaantumiselle. Ekspressiota ilmeni soluissa jo ennen sukurauhasen merkkigeenien ilmenemistä, minkä vuoksi sukurauhassolujen erilaistuminen ei vaikuttanut kovinkaan todennäköiseltä. *FSHR* on tutkitusti ilmentyneenä tietysti sukurauhasten somaattisissa soluissa (Stilley ym. 2014a), mutta tyypillisen sukurauhasiin keskittyvän ekspression ohella reseptorin on havaittu ilmentyvän niin ikään karsinogeenisissa kasvaimissa, monosyyteissä, osteoklasteissa ja napanuoran verisuonten endoteelissä (Kumar 2014). FSH-reseptoria ekspressoidaan samaten esimerkiksi kohdun limakalvon verisuonten endoteelissä, kohdun

sileissä lihassoluissa sekä sikiökalvoissa (Stilley ym. 2014a). Tämän lisäksi *FSHR*-ekspressiota on löydetty kehittyvästä istukasta.

Viime vuosina julkaistut tutkimukset sukurauhasten ulkopuolisesta *FSHR*-ekspressiosta ruokkivat Sertoli-protokollan varhaista *FSHR*-ekspressiota koskevia kysymyksiä: Onko signaali todellinen havainto, ilmentävätkö solut todella *FSHR*-geeniä? Miksi? Mitä kyseiset erilaistuneet solut ovat? Onko mahdollista, että ekspressio syntyy joistain ei-halutuista, kontaminoivista soluista eli voiko käytetty soluviljelyprotokolla johtaa alkioinjaan kuuluvien solujen erilaistumisen ohella myös alkionulkoisten solujen muodostumiseen? Voisiko ekspressio olla peräisin esimerkiksi trofoblastista?

Asian selvittämiseksi pro gradu -tutkielmaani valittiin kaksi hyvin erilaista soluviljelyprotokollaa. Ensimmäisellä protokollalla oli tarkoitus erilaistaa pluripotenteista kantasoluista trofoblastia ja tutkia *FSHR*:n mahdollista ilmentymistä solujen erilaistumisessa. Trofoblastiprotokollan lisäksi kokeet haluttiin toistaa uudelleen protokollalla, jolla oli optimaalista intermediaarisen mesodermin erilaistamisprotokollaa kehitellessä havaittu korkea *FSHR*-ekspressiota (tästä alkaen D-protokolla). Kumpikin protokollista perustui eri kasvutekijöiden avulla tapahtuvaan solujen manipulaatioon. Trofoblastiprotokollalla pyrkimys oli jäljitellä aitoa alkionkehitystä aktivoimalla trofoblastin muodostumiseen yhdistettyjä signaalintireittejä lisäämällä ravinneliuokseen tiettyjä kasvutekijöitä; tässä BMP4-signaalintimolekyylä ja FGF2-inhibiittoria (Koel ym. 2017). Useissa tutkimuksissa on osoitettu, että erilaistumissuunta muuttuu BMP4-indusoiduissa soluissa tehokkaasti mesendodermaaliseen suuntaan FGF2:n lisäyksellä (Yu ym. 2011), minkä johdosta trofoblastisoluja tavoitellessa sovellettiin endogeenisen FGF-signaalinnin inhibitiota (Das ym. 2007; Sudheer ym. 2012).

Trofoblastiprotokollasta poiketen, D-protokolla kehitettiin alun perin alkion solujen erilaistumista silmälläpitäen (Sepponen ym. 2017), joten viljelyolosuhteet pohjattiin eri kasvutekijöiden käyttöön eikä esimerkiksi endogeenista FGF-inhibiointia suoritettu. BMP-signaalinnin tiedetään osallistuvan myös mesodermin ja jossain määrin lisäksi alkionulkoisten solujen erilaistumiseen (Vallier ym. 2009), minkä ohella BMP7 on liitetty esimerkiksi munarakkuloitten kehityksen säätelyyn (Lee ym. 2004, Yoshino ym. 2011). Samoin alkuinduktiossa käytettävän Aktiviini A:n ja CHIR-99021-molekyylin (WNT/ $\beta$ -kateniini-viestinvälityksen aktivaattori) tiedetään aikaansaavan erilaistumista mesendodermaaliseen suuntaan. Rock-inhibiittori parantaa yksittäisten solujen mahdollisuuksia säilyä elossa tehostamalla niiden elinkykyisyyttä (Watanabe ym. 2007). Dorsomorfiini puolestaan on BMP-signaalintimolekyylien inhibiittori, joten sitä lisättiin ravinneliuokseen ehkäisemään liiallista BMP-induktiota (Miyazono ym. 2010).

## Tutkielman tavoite

Tutkielman tavoitteena oli tutkia follikkelia stimuloivan hormonin reseptorigeenin (*FSHR*) ilmentymistä ihmisen pluripotentista soluista kahdella eri soluviljelyprotokollalla erilaistetuissa soluissa. Pyrkimys oli selvittää *FSHR*-signaalin alkuperä ja se, mitä *FSHR*-positiiviset solut ovat. Tarkoituksena oli lisäksi vertailla kontrollisolulinjaa (alkion kantasolujen kaupallinen solulinja, H9) kahteen potilassolulinjaan, joissa on FSH-reseptoria inaktivoiva pistemutaatio Ala189Val, ja tarkastella erilaistumista sekä *FSHR*:n mahdollista roolia solulinjojen erilaistumisessa.



## 2. Yleiset materiaalit ja menetelmät

### Soluviljely

Tässä tutkimuksessa käytetty alkion kantasolulinja, H9 (WiCell Research Institute), on eräs tunnetuimmista ja tutkituimmista kaupallisista pluripotentteistä kantasolulinjoista (Thomson ym. 1998). Alkion kantasoluja käytettiin villityyppikontrollina indusoiduille pluripotentille kantasoluille. Tutkimuksen iPS-solulinjat HEL127.6 ja HEL128.5 on tuotettu kahden Ala189Val-pistemutaatiota kantavan naispotilaan ihon fibroblastisoluista iPS-soluteknologian avustuksella (Helsinki Biomedicum Kantasolukeskus, BSCC). Tutkimusryhmällä on pluripotenttien solujen käyttöön eettisen toimikunnan lupa. Solulinjojen siirrostusnumerot olivat seuraavat: H9 (p44–63), HEL127.6 (p21–45) sekä HEL128.5 (p17–22). Erilaistuskokeiden toistoja suoritettiin kullekin solulinjalle protokollasta riippuen 3–5 kertaa. Poiketen trofoblastiprotokollasta, D-protokolla toteutettiin kolmannella solulinjalla (HEL128.5) vain kerran, sillä muihin solulinjoihin verrattuna solut kasvoivat huonosti ja hitaasti.

Kantasoluja ylläpidettiin ennen kokeiden aloitusta Matrigel® (Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, Phenol Red-Free, Corning®) -päällystetyillä soluviljelymaljoilla pluripotenssia ylläpitävässä E8-viljelyliuoksessa (DMEM/F-12 (+GlutaMAX™) + Essential 8™ Supplement, Gibco® by Life Technologies™). Pluripotentit solut siirrostettiin kolmen tai neljän päivän välein, jakosuhteessa 1:6–1:10. Viljelyliuos vaihdettiin yhden tai kahden päivän välein erilaistumattomuuden ylläpitämiseksi. Solumorfologiaa valvottiin tutkimalla soluja mikroskoopilla ja vertaamalla otettuja kamerakuvia eri siirrostusnumeroiden ja solulinjojen välillä. Soluja säilytettiin soluviljelykaapissa eli inkubaattorissa, jossa lämpötila (+37 °C) sekä hiilidioksiditaso (5 % CO<sub>2</sub>) pysyvät vakaana.

### Trofoblastiprotokolla

Soluviljely pohjattiin julkaistuun tutkimusaineistoon (Koel ym. 2017), jossa soluviljelyolosuhteiden tarkoituksena on pyrkiä jäljittelemään normaalin alkionkehityksen kasvuolosuhteita. DMEM/F-12 (1x L-Glutamine, 15 mM HEPES, Gibco® by Life Technologies™) -pohjaliuokseen lisättiin biokemiallisia kasvutekijöitä, joiden tiedetään ohjaavan kantasolujen erilaistumista trofoblastin suuntaan [Taulukko 1]. Pohjaliuoksen HEPES ja L-Glutamiini sekä liuokseen lisätyt aminohapot (NEAA) tehostavat solujen elinkykyä ja parantavat niiden proliferaatiokykyä (Borbely ym. 2014). BMP4-kasvutekijää (Human Recombinant BMP-4, PeproTech) lisättiin matalalla pitoisuudella (10 ng/ml). Endogeeninen FGF-signaali inhiboitiin käyttämällä molekyyliä PD173074 (Santa Cruz Biotechnology). Soluviljely aloitettiin lähes konfluentteina kasvavista pluripotentteistä

solukolonioista. Viljely tapahtui steriileillä, Matrigel®-päällysteisillä kuusikuoppalevyillä (Costar® 3516, 6 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plates, Corning®), joille solut oli jaettu suhteessa 1:5 päivää ennen viljelyn aloitusta. Kuopat pestiin kahdesti PBS-suolaliuoksella (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco® by Life Technologies™), minkä jälkeen maljoille pipetoitiin ravinneliuosta 1,5 ml kuoppaa kohden.

**Taulukko 1.** Trofoblastiviljelyolosuhteet.

Trofoblastiprotokollan ravinneliuos
DMEM/F-12 (1 x L-Glutamine, 15 mM Hepes)
1 x N2
1 x B27
0,1 mM $\beta$ -mercaptoethanol
1,0 % Non-Essential Amino Acid Solution (NEAA)
0,5 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)
10 ng/ml BMP-4
0,1 $\mu$ M (FGF/VEGF) RTK Inhibitor PD-173074

Trofoblastiviljelyn kesto oli 12 päivää, ja soluviljelyn olosuhteet pidettiin kauttaaltaan samanlaisena kaikissa trofoblastiprotokollan kokeissa kullakin käytetyllä solulinjalla. Ravinneliuos vaihdettiin päivittäin. Tutkielmassa haluttiin lisäksi testata trofoblastiprotokollan ravinneliuoksen vaihtovälin pitkittämistä kahteen päivään, jolloin ravinneliuos vaihdettiin trofoblastiviljelmien soluille päivinä 2, 4, 6, 8 sekä 10.

### D-protokolla

D-protokolla perustuu julkaistuun tutkimusaineistoon (Mae ym. 2013), ja se kehitettiin alkujaan tutkimusryhmämme Sertoli-projektin intermediaarisen mesodermin ja bipotentiaalisen sukurauhasen erilaistamisprotokollaa optimoidessa (Sepponen ym. 2017). Protokollaa on sittemmin muokattu edelleen *FSHR*-ekspression maksimoimiseksi. Poiketen trofoblastiprotokollasta, D-protokollan ravinneliuos [Taulukko 2] pohjasi paitsi komponenteiltaan eri viljelyliuokseen (DMEM/F-12 (+GlutaMAX™) + 2 % B-27® Supplement, Gibco® by Life Technologies™), myös eri kasvutekijöihin. Alkuinduktiossa käytettiin Aktiviini A:ta (M. Hyvösen laboratorio, University of Cambridge, UK), CHIR-99021-molekyyliä (CT99021, HCl, Selleckchem) ja Rock-inhibiittoria (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase inhibitor Y27632, Selleckchem). Myöhemminä päivinä käytettiin BMP7-kasvutekijää (Human Recombinant BMP-7, PeproTech) ja dorsomorfiinia (Dorsomorphin 2HCl, Selleckchem). D-protokollassa solujen erilaistus kesti 8 päivää, ja ravinneliuos vaihdettiin päivinä 1, 2, 4 ja 6.

**Taulukko 2.** D-protokollan viljelyolosuhteet.

D-protokollan ravinneliuos				
d0-d1	d1-d2	d2-d4	d4-d6	d6-d8
DMEM/F-12 + 2 % B-27	DMEM/F-12 + 2 % B-27	DMEM/F-12 + 2 % B-27	DMEM/F-12 + 2 % B-27	DMEM/F-12 + 2 % B-27
Activin A 100 ng/ml	BMP-7 50 ng/ml	Dorsomorphin 2 $\mu$ M		
CHIR 5 $\mu$ M	CHIR 3 $\mu$ M	CHIR 3 $\mu$ M		
Rock inhibitor 10 $\mu$ M				

Viljely suoritettiin steriileillä 12-kuoppalevyillä (Costar® 3513, 12 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plates, Corning®). Tyhjät kuopat pinnoitettiin 2 mM suolahappoliuokseen (HCl) liuotetulla kollageenilla (Human Collagen I, Corning®) pitoisuudella 0,5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>. Liuoksen annettiin vaikuttaa kuopilla kaksi tuntia huoneenlämmössä kasvualustan muodostumiseksi. Tämän jälkeen kollageeni imettiin pois, ja kuoppamaljat jätettiin kuivumaan. 15 minuutin kuluttua kuopat pestiin 3 x PBS-suolaliuoksella.

Seuraavaksi lähes konfluentit, erilaistumattomista soluista koostuvat soluviljelymaljat (Ø 35 mm sekä Ø 60 mm, Corning®) pestiin 1 x PBS:llä. Tämän jälkeen viljelymaljoille pipetoitiin kolonioiden yksisoluisiksi hajottamiseksi 1 ml Accutasea (StemPro® Accutase® Gibco® by Life Technologies™) maljaa kohden, minkä jälkeen maljoja inkuboitiin viisi minuuttia soluviljelykaapissa. Accutasen toiminta pysäytettiin pipetoimalla maljalla 2 ml viljelyliuosta (DMEM/F-12 + 2 % B-27). Solut irrotettiin pohjasta pipetoimalla ja siirtämällä suspensio seuraavaksi yhteen falcon-putkeen. Solususpensiosta pipetoitiin 10  $\mu$ l näyte solulaskuriin. Solutiheydeksi haluttiin 0,6 x 10<sup>6</sup> solua kuoppaa kohden (1,5 x 10<sup>5</sup> / cm<sup>2</sup>), joten tarvittava määrä solususpensiota pipetoitiin uuteen putkeen ja sentrifugoitiin 600 rpm 5 minuutin ajan. Pelletoinnin jälkeen supernatanti poistettiin varovasti imulla. Sitten pelletti suspensioitiin haluttuun aloituspäivän ravinneliuokseen, ja tätä solususpensiota pipetoitiin kuoppamaljoille 1 ml / kuoppa.

## RNA-keräys kuoppalevyiltä tai maljalta

RNA-näytteet kerättiin päivinä 0, 2, 4, 6 ja 8 (trofoblastiprotokollassa lisäksi päivinä 10 ja 12). Ravinneliuos imettiin pois, ja solut pestiin pipetoimalla kuopalle/maljalle PBS-suolaliuosta. Liuoksen poistamisen jälkeen maljalle pipetoitiin toistamiseen samaa liuosta, ja solut irrotettiin suspensioon purskuttelun ja tarvittaessa steriilin soluraaputtimen (Greiner Bio-One) avulla. Solususpensio

siirrettiin pipetoimalla eppendorf-putkeen ja sentrifugoitiin 8000 rpm 1,5 minuuttia. Pelletin muodostumisen myötä supernatantti imettiin pois, ja solut hajotettiin suspensoimalla pelletti 350 µl RA1 -lyysauspuskuriliuokseen NucleoSpin® RNA II -kitin (Macherey-Nagel) ohjeen mukaan.

## **RNA-eristys, DNAasi-käsittely ja RNA:n puhdistus**

RNA-eristys toteutettiin NucleoSpin® RNA II -kitin (Macherey-Nagel) valmistajan ohjeiden mukaan, jättäen kuitenkin ohjeenmukainen DNAasi-käsittely väliin. Eristyksen päätteeksi RNA eluointiin steriiliin nukleasivapaaseen veteen.

Eristetyt RNA-näytteet käsiteltiin erillisellä RNAasi-vapaalla DNAasilla (Promega) kromosomaalisen DNAn poistamiseksi ja RNA:n puhtauden enimmäistämiseksi [Liite 1. Materiaalit ja menetelmät]. Seuraavaksi näytteet puhdistettiin NucleoSpin® RNA Clean-up -kitin (Macherey-Nagel) ohjeita noudattaen, eluoiden puhdistettu ja DNAasi-käsitelty RNA jälleen steriiliin nukleasivapaaseen veteen. Lopuksi RNA:n puhtaus ja saanto määritettiin DeNovix DS-11+ -spektrofotometrillä. Näytteitä säilytettiin -80 °C pakastimessa (lyhytaikainen säilytys -20 °C).

## **cDNA-kääntö**

Geenien ekspression määrittämiseksi haluttiin mitata mRNA:n eli transkriptien määrää. Soluviljelynäytteistä eristetty RNA käsiteltiin käänteiskopioijaentsyymien (RT-reaktio) avulla komplementaariseksi DNA:ksi eli cDNA:ksi, jota voitaisiin monistaa qPCR-menetelmällä. Tarpeellinen määrä RNA:ta reaktiota varten oli 2 µg kutakin näytettä kohden, joten eluoidun RNA:n tarvittava tilavuus laskettiin spektrofotometrin avulla arvioiduista saannoista seuraavalla kaavalla:

$$V1 = \frac{100 \text{ ng/ml} \times 20 \text{ µl}}{\text{konsentraatio}}$$

RNA:n saannon jäätyä matalaksi (<100 ng/ml, eli haluttu 2 µg RNA:ta / 20 µl eli reaktion kokonaistilavuus) RNA-näyte kuivattiin vakuumissa (Speed Vac® SC110, Savant), jolloin tarvittavan eluoidun RNA-näytteen tilavuus saatiin riittävän matalaksi ( $\leq 11 \text{ µl}$ ). Tarvittaessa RNA-näytteen määrä täytettiin steriilillä nukleasivapaalla vedellä, jotta RNA+H<sub>2</sub>O-määrä saatiin haluttuun tilavuuteen (11 µl). RNA-näytteet denaturoitiin pitämällä näytteitä minuutin ajan +65 °C, minkä jälkeen loput 9 µl reaktiotilavuudesta täydennettiin muilla komponenteilla [Liite 1. Materiaalit ja menetelmät]. Seuraavaksi näytteitä inkuboitiin 90 minuuttia +37 °C. RT-reaktio pysäytettiin siirtämällä näytteet viideksi minuutiksi +95 °C. Lopuksi näytteet laimennettiin 1:1 steriilillä nukleasivapaalla vedellä ja varastoitiin -20 °C.

## qPCR

Erilaistuneet solut ilmentävät eri geenejä kuin pluripotentit solut, jolloin geenien ilmentymisen mittauksella on mahdollista päätellä, mitä soluja soluviljelyssä on erilaistunut. Merkkigeenien aktiivisuutta tutkittiin cDNA-käännön jälkeen suoritettavan kvantitatiivisen polymeeraasi-ketjureaktion avulla [Liite 1. Materiaalit ja menetelmät]. Näytteet pipetoitiin duplikaatteina 96-kuoppalevyille (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, Roche). Ajoin suoritettiin LightCycler® 96 -laitteella (Roche). Kaikissa ajoissa käytetyt alukeparit sekä qPCR-ajon ohjelma ovat lueteltuna liitteissä [Liite 1. Materiaalit ja menetelmät]. Alukkeiden oikea pituus tarkistettiin ajamalla niistä agarosigeelielektroforeesi.

qPCR-menetelmä perustuu halutun geenin mallijuosteen eksponentiaaliseen monistamiseen alukkeiden, lämpötilavaihteluiden ja entsyymireaktioiden avulla, jolloin monistuvan geenituotteen määrää voidaan seurata sykleissä. Sulamiskäyrien perusteella voidaan varmistaa tuotteiden puhtaus ja monistuminen oikeassa koossa ja oikeassa lämpötilassa. Käyrien tulisi olla yhteneviä kaikille saman mallijuosteen ja alukkeen näytteille, jolloin poikkeavien käyrien perusteella mahdolliset epäpuhtaat näytteet voidaan sulkea pois tulosten tarkastelusta. Kynnyssykli ( $C_q$ ) on arvo, jossa näytteen tuottama signaali ylittää kynnyksarvon.  $C_q$ -arvot normalisoitiin komparatiivisen menetelmän vuoksi vertaamalla saatuja  $C_q$ -arvoja endogeeniseen kontrolligeeniin *CYCLO G*. Negatiivisena kontrollina käytettiin RT-reaktiota ilman mallijuostetta. Näin saatuja arvoja verrattiin lopuksi soluviljelyiden alkupäivänä (d0) erilaistumattomista soluista otettujen näytteiden arvoihin, jotta saatiin suhteellinen muutos lähtötasoon nähden. Suhteutus tapahtui  $\Delta\Delta C_q$ -laskukaavan [Liite 1. Materiaalit ja menetelmät] avulla (Livak & Schmittgen 2001).

## FSH-stimulaatio

FSH-stimulaatiot suoritettiin pääsääntöisesti viljelmien viimeisinä päivinä, trofoblastiprotokollassa siis päivänä 12, D-protokollassa päivänä 8. Trofoblastiprotokollalla stimulaatio kokeiltiin toteuttaa lisäksi päivinä 4 ja 8, jotta saatiin haarukoitua optimaalisinta aikaa stimulaation toteutukselle. mRNA-ekspression mittausta varten stimulaation kesto oli 8 tuntia. Kokeen etenemisen myötä maljoilta kerättiin RNA-näytteet normaaliin tapaan päivästä 0 alkaen protokollan mukaisesti, jotta varmistettiin kontrolloitu erilaistuminen aiempiin erilaistuskokeisiin verrattuna.

Kuopat pestiin ennen stimulaation aloitusta 2 x PBS:llä. Trofoblastiprotokollan kuusikuoppamaljoille pipetoitiin 1,5 ml / kuoppa DMEM/F-12 (+GlutaMAX™) -pohjaliuokseen laimennettua FSH:ta (Human Recombinant Follicle Stimulating Hormone, ProSpec-Tany TechnoGene Ltd) neljässä eri pitoisuudessa: 0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml ja 100 ng/ml. D-protokollan stimulaatioissa FSH

laimennettiin viljelyliuokseen DMEM/F-12 + 2 % B-27, ja FSH-laimennosta pipetoitiin 12-kuoppalevyillä viljelyille soluille kuoppaa kohden vain 0,5 ml. Positiivisena kontrollina FSH:lle käytettiin 10  $\mu$ M forskoliinia (F3917, SIGMA), sillä FSH:n tavoin se on adenylaattisyklaasin aktivaattori ja nostaa siten syklisen AMP:n tasoja. Stimulaatiolaimennosten pipetoimisen jälkeen maljat siirrettiin takaisin inkubaattoriin.

Stimulaatioiden jälkeen RNA-näytteiden keräys sujui tavanomaisesti, eli maljat pestiin 1 x PBS:llä, minkä jälkeen solut lyysattiin RA1-puskuriin. Tarvittaessa stimulaatioliuokset otettiin talteen maljoilta ja varastoitiin.

## **cAMP-analyysi**

FSH-stimulaatioiden jatkotoimenpiteenä oli syklisen AMP:n kvantitatiivinen määrittäminen. cAMP-analyysi suoritettiin ainoastaan D-protokollan mukaan viljelyille soluille. cAMP-näytteitä varten tehtävät viljelyt aloitettiin samaan tapaan kuin tavalliset FSH-stimulaatiot. Päivänä 8 solut pestiin kahdesti PBS:llä, minkä jälkeen niille pipetoitiin kuoppaa kohden 0,5 ml viljelyliuokseen laimennettua FSH:ta (eri pitoisuudet väliltä 0 ng/ml – 100 ng/ml) sekä 10  $\mu$ M forskoliinia.

Soluja inkuboitiin tunti soluviljelykaapissa, minkä jälkeen liuokset poistettiin ja kuopille pipetoitiin 0,5 ml / kuoppa 0,1 M suolahappoliuosta (HCl). HCl-käsittelyn tarkoituksena oli pysäyttää endogeenisen fosforiesteriäsin toiminta ja mahdollistaa näytteiden analysointi suoraan ilman väliprosessointia. Suolahappoliuosta pidettiin maljoilla 20 minuuttia yhtenäisen lyysautumisen takaamiseksi, minkä päätteeksi solut suspensioitiin maljalle, pipetoitiin eppendorf-putkiin ja sentrifugoitiin. Solusakan muodostettua pelletin putken pohjalle supernatantti siirrettiin uuteen putkeen ja säilöttiin -80 °C. cAMP-analyysi toteutettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti (Direct cAMP ELISA -kitti, Enzo Life Sciences).

## **Immunosytokemialliset värjäykset**

Soluille suoritettiin muiden analysointimenetelmien ohella immunologiaan perustuvia vasta-ainevärjäyksiä, joiden tarkoituksena on paikantaa haluttuja molekyylejä, yleensä proteiineja, tutkittavista näytteistä. Menetelmän idea on käytetyn vasta-aineen ja sen tunnistaman antigeenin vuorovaikutus, jolloin vasta-aineen sitoutuminen antigeeniin paljastaa tutkitun molekyylin sijainnin. Tämä reaktio voidaan visualisoida sopivalla merkkiaineella, jota voidaan havainnoida esimerkiksi fluoresenssimikroskoopilla. Tutkimusryhmässämme käytetään immunofluoresenssipohjaista epäsuoraa menetelmää, jossa ensimmäinen, primaarivasta-aine ei sisällä merkkiainetta, mutta sen tarkoitus on kiinnittyä tutkimuksen kohteena olevaan molekyyliin; tässä tutkielmassa ensisijaisesti

FSHR-proteiiniin. Toiseen, sekundaarivasta-aineeseen puolestaan liitetään merkkiaineeksi fluorokromi. Sekundaarivasta-aineen sitoutuminen primaarivasta-aineeseen voidaan lopulta havaita mikroskoopilla fluoresenssina merkkiaineen ansiosta.

Värjäyksiä varten soluja kasvatettiin joko normaalisti viljelymaljan pohjaan kiinnittyneenä tai vaihtoehtoisesti peitinlaseilla. Solut pestiin kerran PBS:llä, minkä jälkeen soluja käsiteltiin kiinnitysaineella eli 4 % paraformaldehydillä (PFA) 15 minuutin ajan huoneenlämmössä. Kuopat pestiin kolmesti PBS:llä PFA:n poistamiseksi. Solukalvon permeabilisointi suoritettiin tarvittaessa PBS:ään liuotetulla Triton® X-100 -seoksella (Fisher Scientific) (vasta-aineesta riippuen joko 0,5 % tai 0,15 %), minkä annettiin vaikuttaa kuopilla 15 minuutin ajan. Tämän jälkeen kuopat pestiin jälleen 3 x PBS. Seuraavaksi kuopille pipetoitiin Ultra Vision Protein Block -liuosta (Thermo Scientific) epäspesifisen sitoutumisen ehkäisemiseksi, ja liuoksen annettiin vaikuttaa 8 minuutin ajan. Liuos poistettiin ennen vasta-ainelaimennosten pipetoimista.

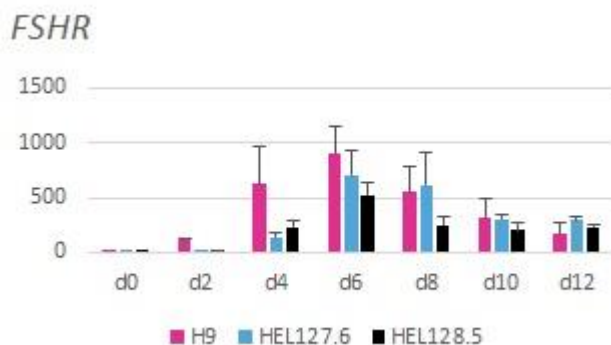
Primaarivasta-aineina käytettiin muun muassa useampia FSHR-vasta-aineita eri laimennoksilla. Parhaiten FSHR-vasta-aineista toimii FSHR 323 (N. Ghinean laboratorio, Curie Institute). Vasta-ainetta käytettiin pitoisuudella 3 µg/ml ja 5 µg/ml, sytokeratiini 7:n värjäämiseen puolestaan Anti-Cytokeratin 7 -vasta-ainetta (ERP1619Y, Cytoskeleton Marker ab68459, Abcam®) laimennoksella 1:200. Sytokeratiini 7 (CK7) on *KRT7*-geenin koodaama proteiini – tässä tutkielmassa sekä geenistä että proteiinista käytetään kuitenkin selkeyden vuoksi nimeä KRT7. Vasta-aineet laimennettiin 0,1 % Tween (Fisher Scientific) -PBS:ään. Primaarivasta-aineiden annettiin vaikuttaa yön yli +4 °C. Seuraavana päivänä kuopat pestiin 3 x PBS-liuoksella ja inkuboitiin 30–45 minuuttia sekundaarivasta-ainelaimennoksessa valolta suojattuna. Sekundaarivasta-aineet Alexa Fluor 488® donkey anti-rabbit IgG (H+L) / GREEN ja Alexa Fluor 555® donkey anti-mouse IgG (H+L) / RED (Invitrogen) laimennettiin niin ikään 0,1 % Tween-PBS:llä suhteessa 1:1000. Lopuksi solut pestiin 3 x PBS-liuoksella, minkä päätteeksi soluille pipetoitiin VECTASHIELD® Mounting Medium with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) -petausliuosta (Vector Laboratories) ja peitettiin peitinlasilla. Vasta-aineiden sitoutumisen analysointi tapahtui epifluoresenssimikroskoopilla Axio Imager (Zeiss).

### 3. Tulokset

#### Trofoblastiprotokollan aikaansaama soluerilaistuminen

Tutkimuksessa haluttiin selvittää, ekspressoituuko *FSHR* trofoblastiprotokollan erilaistuksissa ja mikäli ekspressiota on, mitä mahdolliset *FSHR*-positiiviset solut ovat ja mitä muita geenejä solut ilmentävät. Tarkoituksena oli vertailla eri solulinjoja toisiinsa, joten alkion kantasolulinjaa H9 käytettiin kontrollina kahdelle *FSHR*-mutaatiota kantavalle potilassolulinjalle (HEL127.6 ja HEL128.5). Pluripotentteja soluja erilaistettiin 12 päivän ajan trofoblastin erilaistumiseen liitettyjä kasvutekijöitä sisältävässä ravinneliuoksessa.

Trofoblastiprotokollan solut ekspressoivat *FSHR*-geeniä selkeästi [Kuva 5]. Erilaistumattomissa soluissa (d0) ekspressiota ei juurikaan ole, mutta erilaistumisen myötä ekspressio kasvaa lähes tuhatkertaiseksi. Ekspressio näyttäisi kaikilla solulinjoilla saavuttavan huippunsa pääsääntöisesti päivänä 6, joskin yksittäisessä HEL127.6-solujen toistokokeessa huippu on päivänä 8. Viljelyiden loppupäiviä kohti ekspressio hiipuu, solulinjoilla H9 ja HEL128.5 jo päivään 8 mennessä, toisella potilassolulinjalla HEL127.6 vasta päivään 10 siirryttäessä. Hajonta (keskiarvon keskivirhe eli SEM) on suurempaa kontrollisolulinjalla H9 ja potilaslinjalla HEL128.5 kuin solulinjalla HEL127.6.

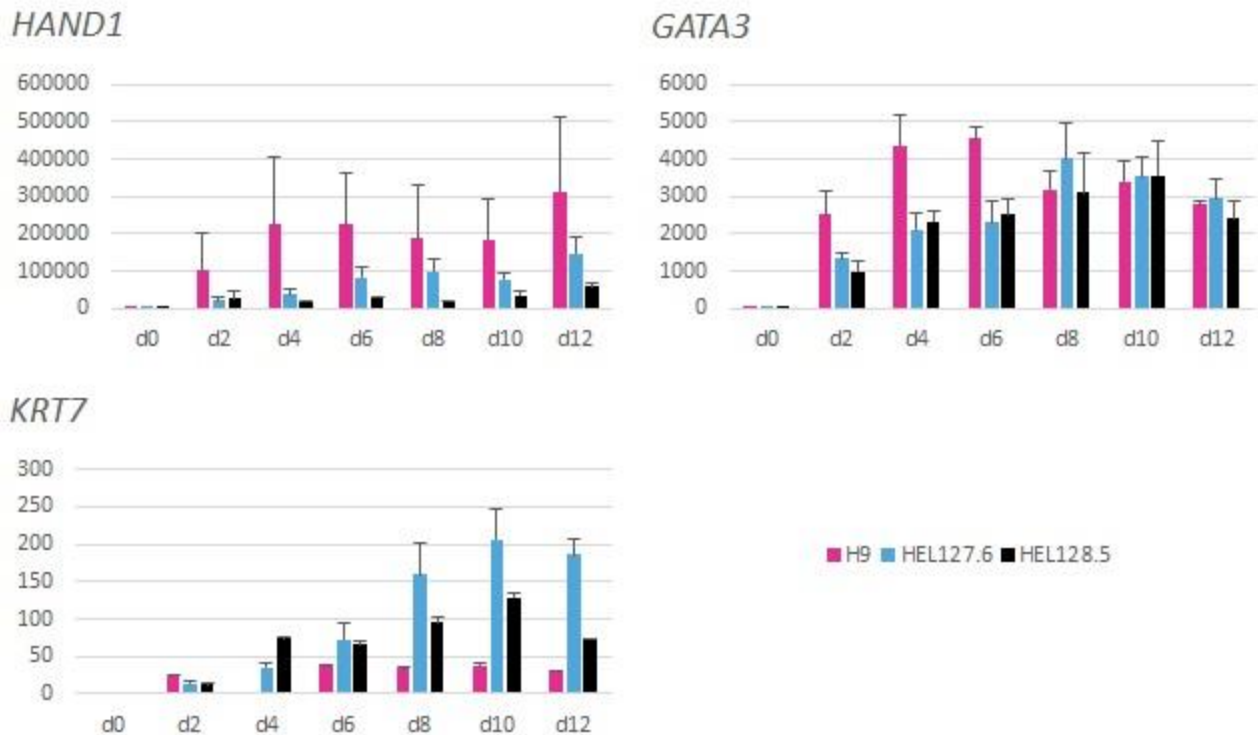


**Kuva 5.** *FSHR*-ekspressio trofoblastiprotokollan viljelmissä. Kontrollisolulinjan (H9) geeniekspressio ilmaistu kuvassa punaisella, ensimmäinen potilaslinja (HEL127.6) sinisellä, toinen potilaslinja (HEL128.5) mustalla. Y-akseli kuvastaa ekspressiotasoa, X-akseli puolestaan aikapisteitä. *FSHR*-tasot kohoavat viljelmien puolivälissä, päivänä 6. Jokainen palkki kuvastaa laskettua keskiarvoa  $\pm$  SEM kolmesta eri toistosta.

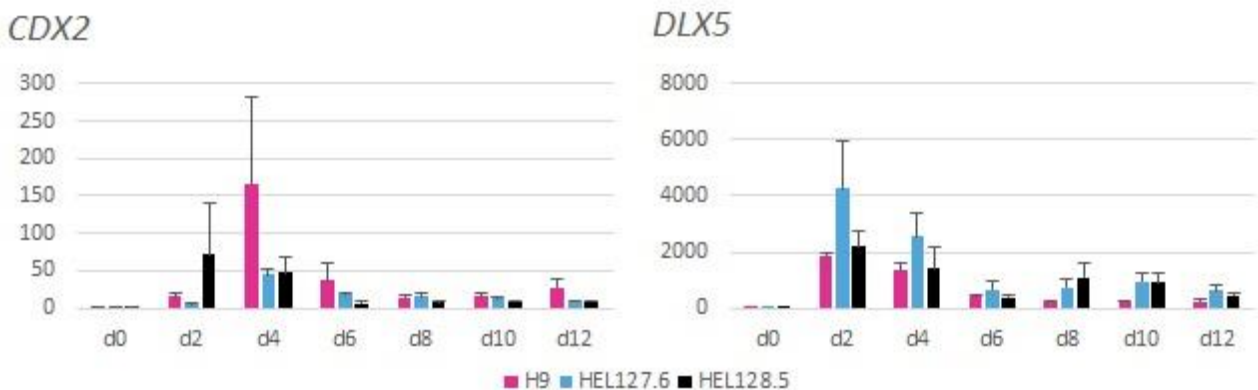
Osittain *FSHR*-ekspressio näyttäisi samansuuntaiselta trofoblastimerkkigeenien [Kuva 6] kanssa. Tutkimuksessa trofoblastille tyypilliset merkkigeenit (*HAND1*, *GATA3*, & *KRT7*) ekspressoituvat viljelmissä merkittävästi, *KRT7* vähemmän kuin muut. Erilaistumattomissa soluissa eli päivänä 0 trofoblastimerkkigeenien ekspressiota ei juurikaan ole (*KRT7*-geeniä lukuun ottamatta Cq-arvot ovat korkeita). Geeni *HAND1* ekspressoituu trofoblastiprotokollan soluissa todella voimakkaasti, etenkin solulinjalla H9. Potilassolulinjoilla ekspressio on vähäisempää. H9-soluilla tehtyjen kokeiden välillä



on kuitenkin suuria eroja, mistä suuret keskiarvon keskivirhettä kuvastavat virhepalkit (error bars) kertovat. Kaikilla solulinjoilla *HAND1*-ekspressio nousee viljelyiden loppupäivää kohti. Samaten *GATA3*-ekspressio on melko korkeaa. Solulinjalla H9 huippu saavutetaan FSHR:n tavoin päivänä 6, potilaslinjoilla HEL127.6 päivänä 8 ja HEL128.5 päivänä 10. Samoin *KRT7*:n ekspressio nousee loppupäiviä kohti, erityisesti toisella potilaslinjalla HEL127.6. Potilaslinjoilla huippukohta on päivänä 10, H9-soluilla päivänä 6. H9-soluilla *KRT7*-ekspressio on hyvin vähäistä.



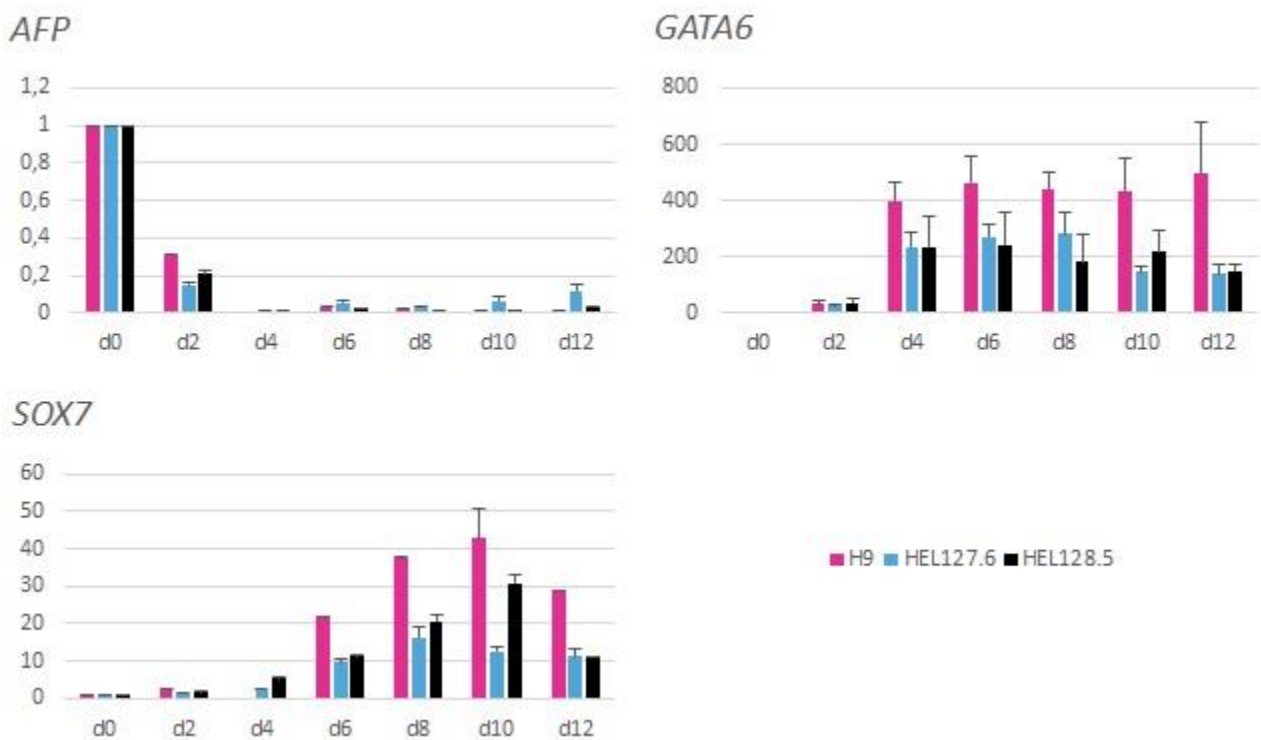
**Kuva 6.** Trofoblastiprotokollalla viljeltyjen solujen geeniekspressio trofoblastimerkkigeneistä. H9-solulinja kuvassa punaisella, potilaslinja HEL127.6 sinisellä ja HEL128.5-potilaslinja mustalla. Vertikaalisella Y-akselilla ekspressiotasot, horisontaalisella akselilla näytteenoton aikapisteet. Trofoblastin merkkigeenit ekspressoituvat käytetyllä protokollalla, etenkin *HAND1*.



**Kuva 7.** Varhaisten trofoblastimerkkigeenien ekspressio trofoblastiprotokollan soluviljelmissä. Geenin *CDX2* ekspression hajonta on hyvin suurta. *DLX5* ekspressoituu alkupäivinä voimakkaasti.

Muista trofoblastimerkkigeeneistä [Kuva 7] *CDX2* nousee etupäässä päivänä 4, etenkin kontrollisolulinjana käytetyissä alkion kantasoluissa (H9). *HAND1*-geenin tapaan trofoblastin merkkigeenien *CDX2* ja *DLX5* ekspressioiden hajonta on suurta toistojen välillä, etenkin H9-soluilla. Lukemat putoavat alkupäivien jälkeen matalalle tasolle. Eritoten solulinjalla H9 päivästä 4 päivään 6 *CDX2*-ekspression vaimentuminen on huomattavaa. *DLX5*:n ekspressio on korkeinta HEL127.6-solulinjalla. Kaikilla solulinjoilla huippukohta saavutetaan jo päivänä 2, minkä jälkeen ekspressio hiipuu muutamaksi päiväksi ja nousee hieman sen jälkeen.

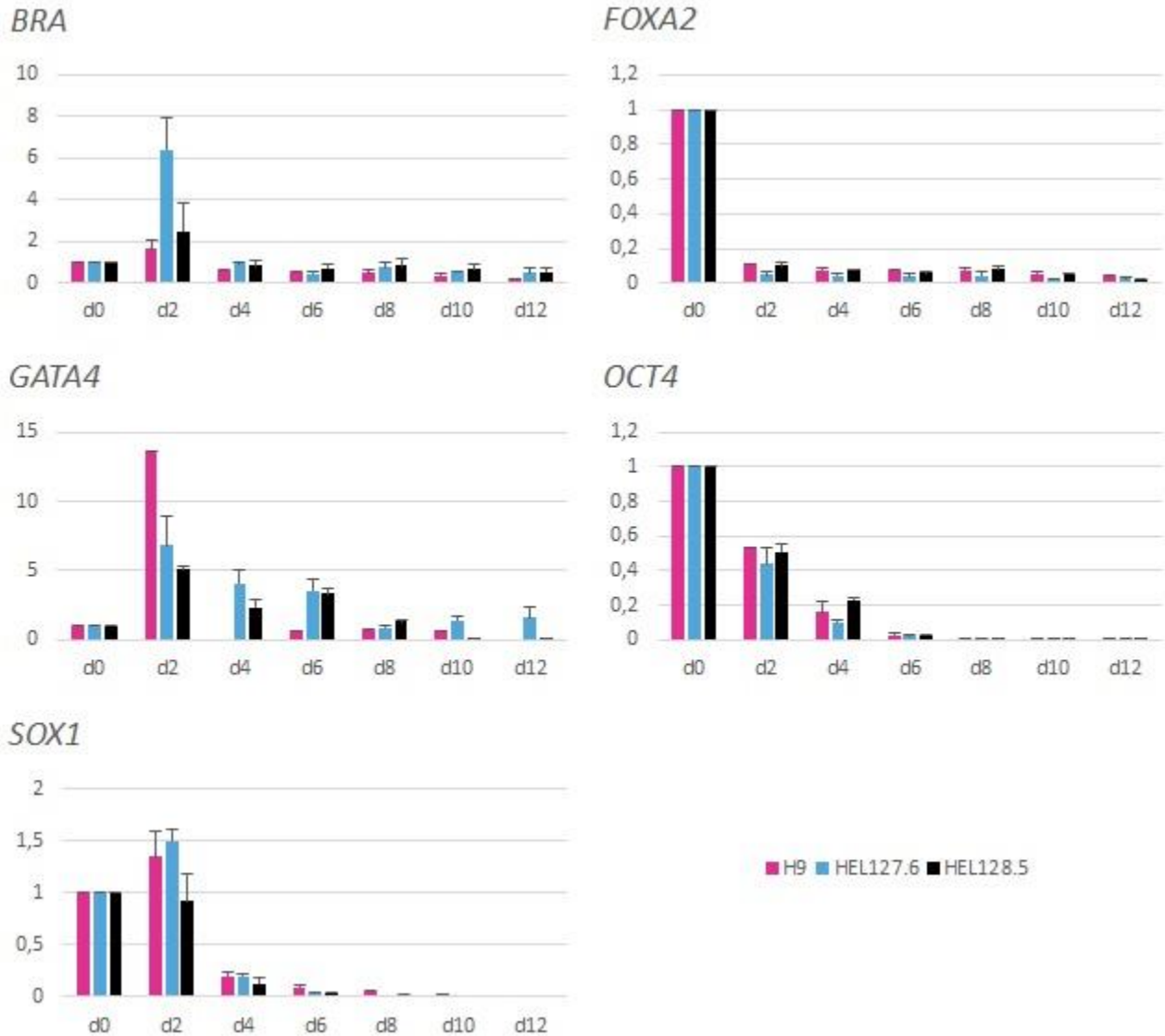
Alkiosolujen ulkopuolisista merkkigeeneistä [Kuva 8] *AFP* ei ekspressoidu solulinjoissa. *GATA6*-geenin ekspressio on melko korkea: ekspressiotasot nousevat hieman viljelyn loppua kohden kontrollisolulinjalla H9 (huippu päivänä 12), toisin kuin potilaslinjojen soluissa, joilla ekspressio hieman laskee. *SOX7*-ekspressiotasot ovat matalahkot, eniten sitä ekspressoidaan H9-soluissa. Huippukohta saavutetaan viljelmien loppupuolella, päivänä 8 (HEL127.6) tai päivänä 10 (H9 ja HEL128.5), minkä jälkeen ekspressio laskee.



**Kuva 8.** Alkion ulkopuolisten merkkigeenien ilmentyminen trofoblastiprotokollalla. Erot geenien ekspressiossa ovat suuria: *AFP* ei ekspressoidu soluissa, *GATA6*-ekspressio on voimakasta, geenin *SOX7* ekspressio puolestaan maltillista.

Trofoblastiprotokollan ei-trofoblastisista merkkigeeneistä [Kuva 9] *BRA*-ekspressio on hyvin vähäistä. Endodermaalinen merkkigeeni *FOXA2* ei ekspressoidu millään solulinjalla. Alkion soluista kertova *GATA4*-ekspressio nousee hiukan päivänä 2, etenkin H9-soluissa, mutta putoaa hyvin vähäiselle tasolle sen jälkeen. Potilassolulinjoissa ekspressiota on kuitenkin enemmän kuin

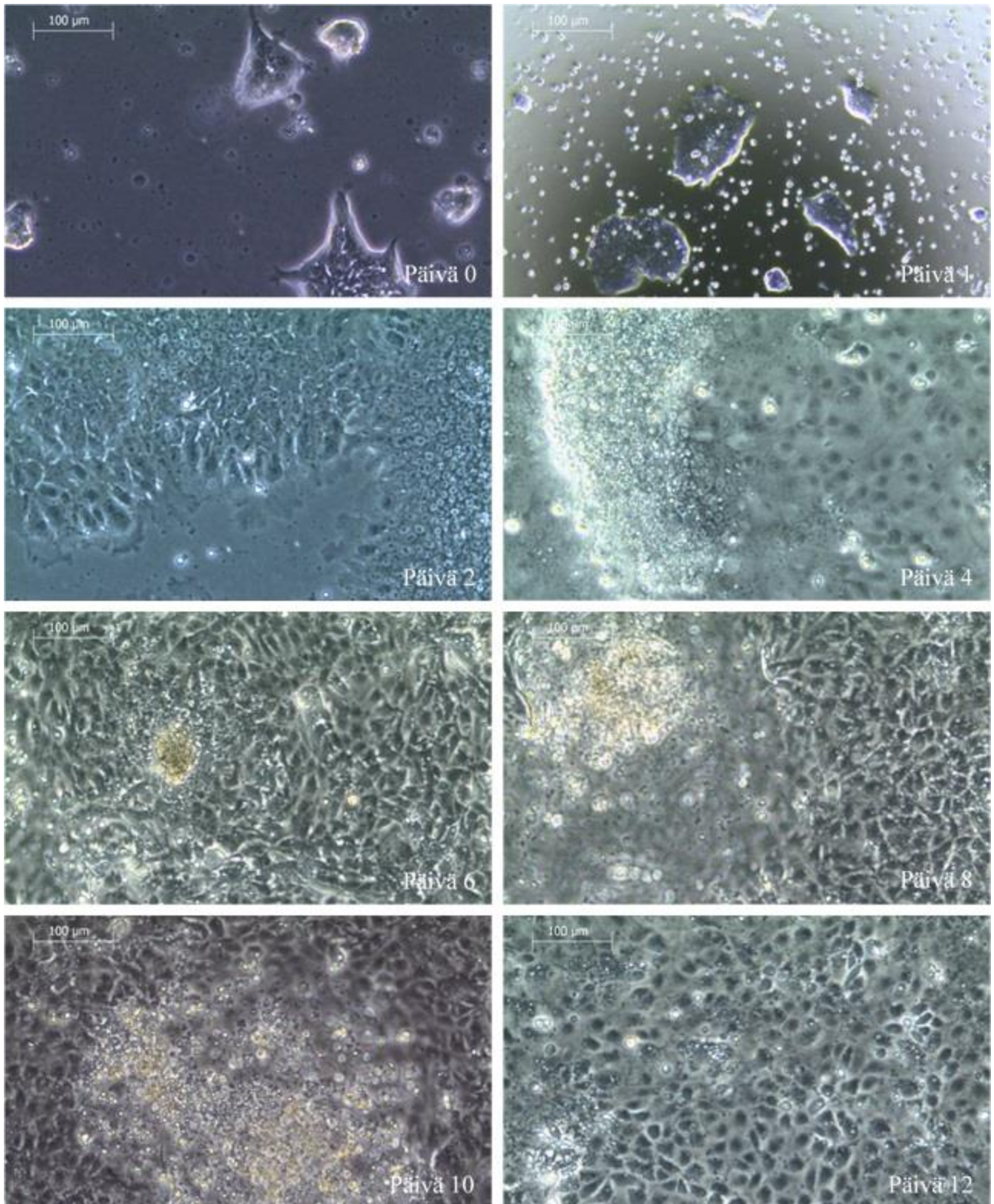
kontrollisolulinjalla H9. Pluripotenssista kertova *OCT4* ei ekspressoitu erilaistuvissa soluissa millään solulinjalla, ekspressiotasot selkeästi laskevat alkupäivästä (d0) päivään 4 mennessä. Ekspressiota ei ole myöskään neuroektodermigeenillä *SOX1*, jonka tasot putoavat päivän 2 jälkeen.



**Kuva 9.** Trofoblastiprotokollalla viljeltyjen solujen ei-trofoblastisten merkkigeenien ekspressio. H9-solujen geeniekspressio kuvassa punaisella, potilassolulinja HEL127.6 sinisellä ja potilaslinja HEL128.5 mustalla. Y-akseli kuvastaa ekspressiotasoja, X-akseli aikapisteitä. Ei-trofoblastisten geenien ekspressio on hyvin matalaa.

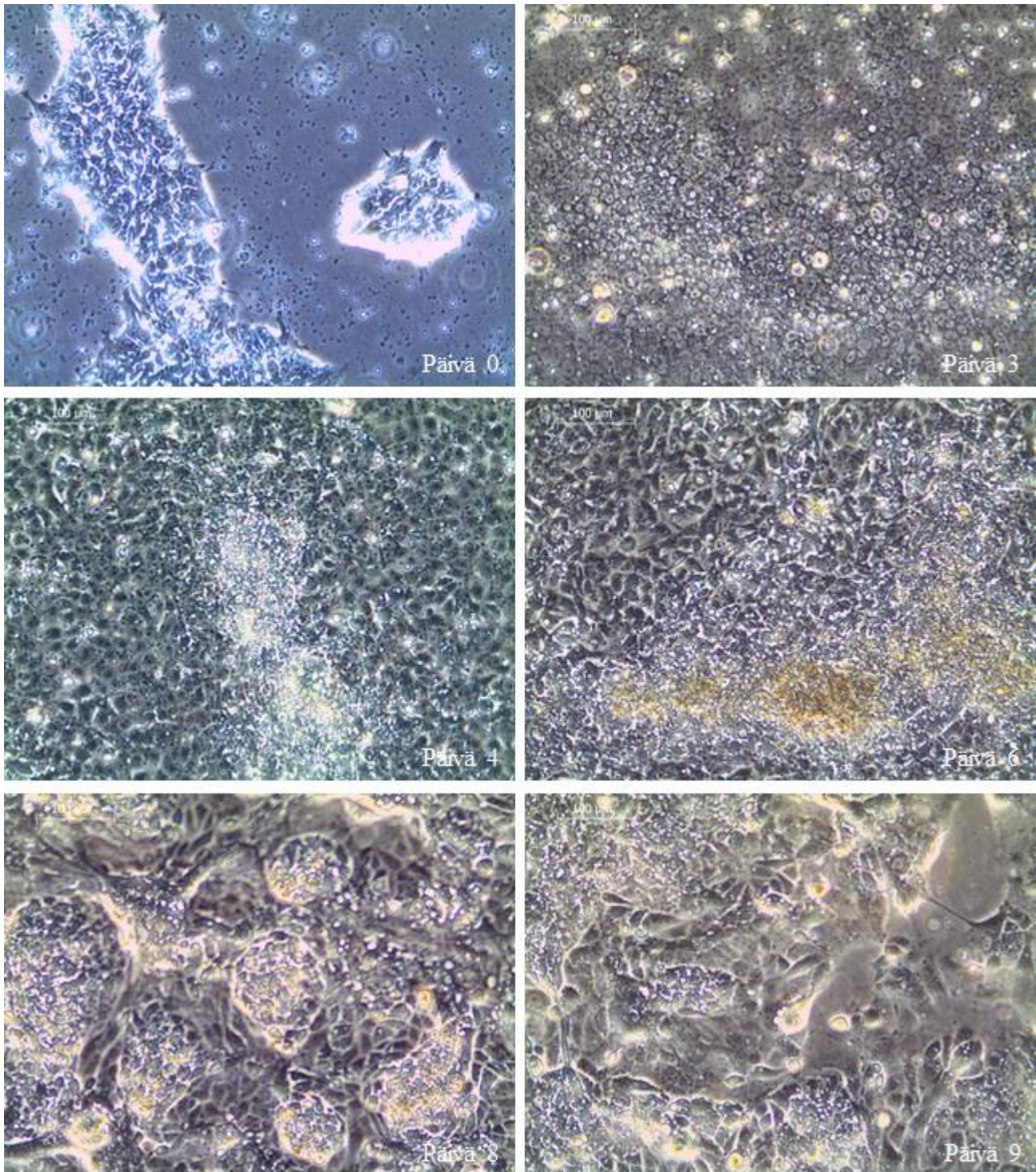
Trofoblastiprotokollalla viljeltyjen solujen erilaistuminen on johdonmukaista toistojen välillä. Morfologiassa ei ilmene liiemmin eroja solulinjojen sisällä: kontrollilinjalla H9 solut [Kuva 10] levittäytyvät tehokkaasti maljoille päivään 4 mennessä, kasvavat pääsääntöisesti hyvin ja erilaistuvat samaan tapaan kuin potilaslinjojen solut [Kuva 11].





**Kuva 10.** Trofoblastiprotokollalla viljeltyjä H9-soluja erilaistumassa kokeessa 2. Kymmenkertainen suurennos (10x). Erilaistumisen myötä solujen morfologia muuttuu selkeästi alun yksittäisistä, erilaistumattomista solurykelmistä. Asteittaisen erilaistumisen ohella solut alkavat levittäytyä tehokkaammin maljoille mattomaiseksi kasvustoksi. Solut myös kasvavat kokoa.

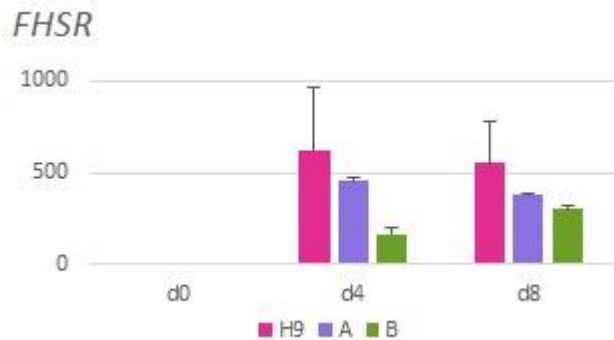




**Kuva 11.** Trofoblastiprotokollalla viljeltyjä HEL128.5-soluja erilaistumassa kokeessa 6. Käytössä on kymmenkertainen suurennos (10x). Alkupäivien solurykelmistä kehittyi erilaistumisen myötä tiheämpää solumattoa, josta on selkeästi havaittavissa variaatiota morfologiassa ja solujen koossa. Verrattuna H9-soluihin HEL128.5-solut kasvavat hiukan harvemmassa.

### **Ravinneliuoksen vaihtovälin vaikutus**

Tutkimuksessa testattiin kertaalleen lisäksi ravinneliuoksen vaihtovälin vaikutusta trofoblastiprotokollalla solujen erilaistumiseen ja merkkigeenien ekspressioon.

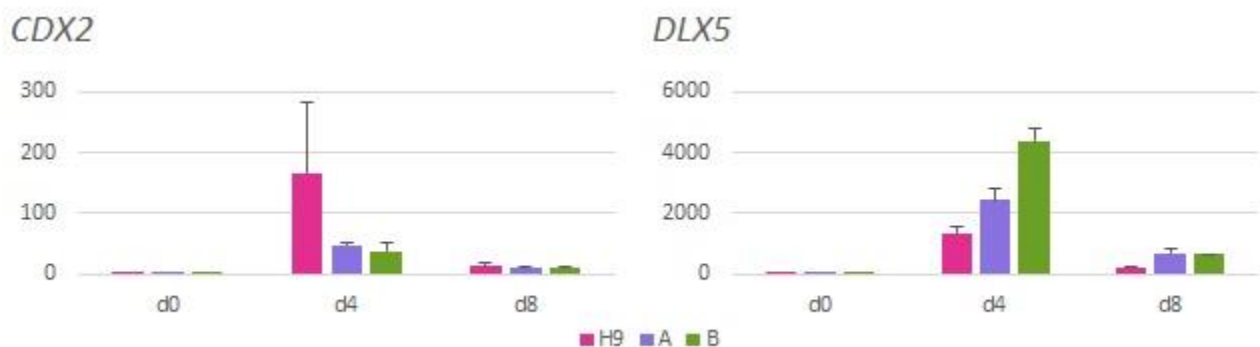


**Kuva 12.** Trofoblastiprotokollalla viljeltyjen solujen *FSHR*-ekspressio eri ravinneliuoksen vaihtoväleillä. Y-akselilla geeniekspressio, X-akselilla aiempien H9-kokeiden keskiarvo (punainen) sekä A = ravinneliuoksen vaihto päivittäin (violetti) ja B = ravinneliuoksen vaihto joka toinen päivä (vihreä).

*FSHR*:n ilmentyminen on huomattavasti korkeampaa, kun ravinneliuos vaihdettiin normaaliin tapaan joka päivä [Kuva 12]. Trofoblastimerkkigeenien tuloksissa on vaihtelua: geeniä *GATA3* ekspressoidaan enemmän, kun ravinneliuos vaihdettiin joka toinen päivä [Kuva 13]. *HAND1*-geeniekspressio on korkeampaa normaalilla vaihtovälillä. Varhaisista trofoblastin merkkigeeneistä [Kuva 14] *CDX2*:n ekspressioon ravinneliuoksen vaihtovälillä ei vaikuta olevan suurta merkitystä. *DLX5*:n geeniekspressio sen sijaan kasvaa, kun mediaa vaihdetaan vain joka toinen päivä.



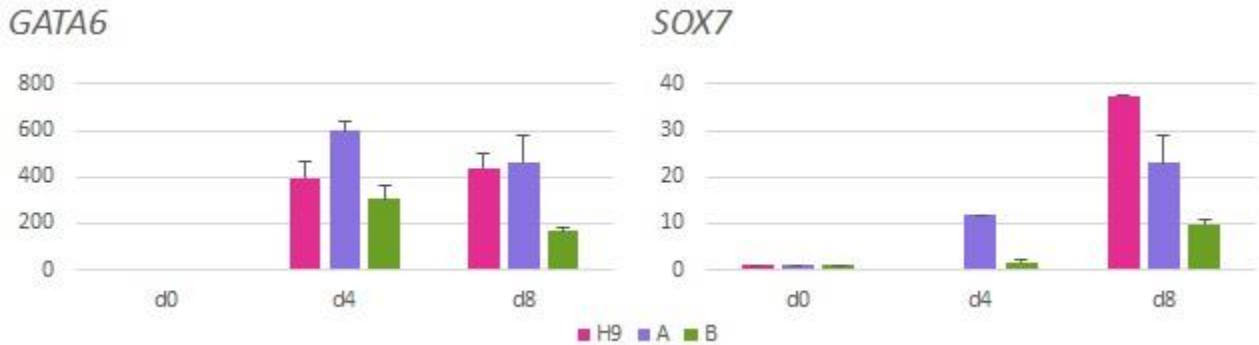
**Kuva 13.** Trofoblastimerkkigeenien ekspressio eri vaihtoväleillä. Punainen palkki H9-kokeiden keski-arvo, A = ravinneliuoksen vaihto päivittäin ja B = ravinneliuoksen vaihto joka toinen päivä.



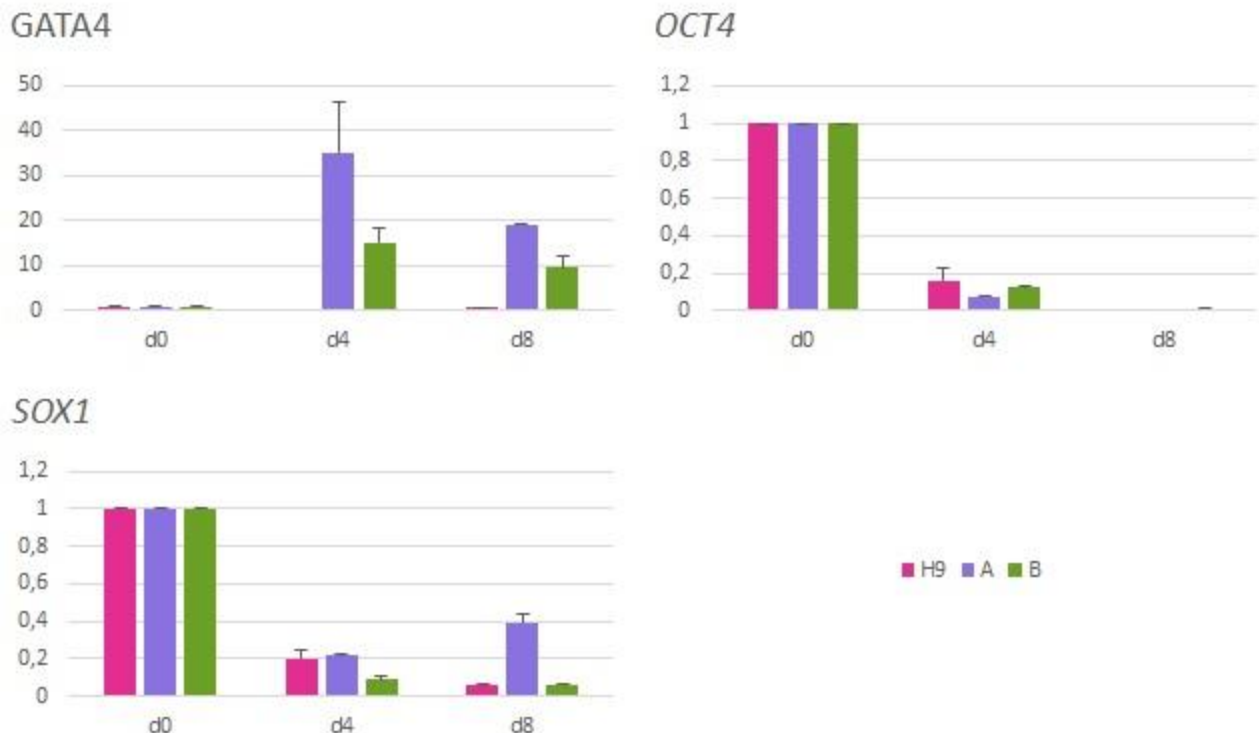
**Kuva 14.** Varhaisten trofoblastigeenien ekspressio. Punainen palkki kuvastaa H9-kokeiden keskiarvoa, A = ravinneliuoksen vaihto päivittäin ja B = ravinneliuoksen vaihto joka toinen päivä.



Alkion ulkopuolisten merkkigeenien (*GATA6* ja *SOX7*) ekspressio on korkeampaa normaalilla ravinneliuoksen vaihtovälillä [Kuva 15]. Sen sijaan ei-toivottujen geenien ekspressiossa [Kuva 16] tuloksissa on vaihtelua. *GATA4*-geeniä ekspressoidaan joka toinen päivä vaihdetun ravinneliuoksen soluissa vähemmän kuin päivittäin vaihdetun ravinneliuoksen soluissa. Pluripotenssitekijä *OCT4*:n tai geenin *SOX1*:n ekspressioon ravinneliuoksen vaihtovälillä ei näytä olevan vaikutusta.



**Kuva 15.** Trofoblastiprotokollan solujen ekspressio alkionulkoisista merkkigeeneistä. Punainen palkki = H9-solujen keskiarvo, A = ravinneliuoksen vaihto päivittäin ja B = ravinneliuoksen vaihto joka toinen päivä. Alkionulkoisten solujen merkkigeenien ekspressio on korkeampaa, kun ravinneliuos vaihdetaan päivittäin.

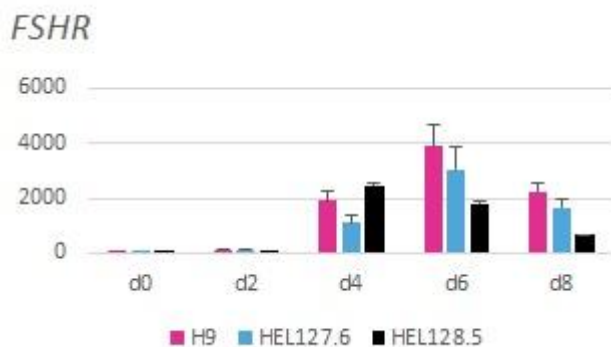


**Kuva 16.** Ei-trofoblastisten merkkigeenien ekspressio eri ravinneliuoksen vaihtoväleillä. Punaisella H9-keskiarvo, A = ravinneliuoksen vaihto päivittäin ja B = ravinneliuoksen vaihto joka toinen päivä. Geenien ekspression kannalta ravinneliuoksen vaihtovälillä ei vaikuta olevan suurta merkitystä.

## Solujen erilaistuminen D-protokollan viljelmissä

D-protokolla valikoitui trofoblastiprotokollan rinnalle, koska sen tiedettiin erilaistavan *FSHR*-positiivisia soluja. Tutkielmassa haluttiin selvittää, voisiko D-protokollan viljelyissä ilmenevä *FSHR*-ekspressio johtua esimerkiksi trofoblastikontaminaatiosta viljelmissä eli toisin sanoen siitä, että alkionulkoisten solulinjojen erilaistumista ei saada täysin estettyä käytetyillä soluviljelymenetelmillä.

D-protokollan [Kuva 17] myötä solut ekspressoivat enemmän *FSHR*-geeniä kuin trofoblastiprotokollan solut [Kuva 5]. Erilaistumattomissa soluissa (päivä 0) ekspressiota ei ilmene. Ekspression huippu on päivänä 4 solulinjassa HEL128.5, päivänä 6 solulinjoissa H9 ja HEL127.6. Tämän jälkeen ekspressio laskee hieman. Hajontaa solulinjojen sisällä tai välillä ei mainittavasti esiinny.



**Kuva 17.** Geenin *FSHR* ekspressio D-protokollan viljelmissä eri solulinjoissa: H9-kontrollisolut punaisella, HEL127.6-potilaslinja sinisellä ja HEL128.5 mustalla. Ekspressiotasot vertikaaliakselilla, aikapisteet päivään 8 asti horisontaaliakselilla. Ekspressio on korkeampaa kuin trofoblastiprotokollan soluissa, ja suurinta solulinjalla H9. Jokainen palkki kuvastaa laskettua keskiarvoa  $\pm$  SEM 3-5 eri toistosta.

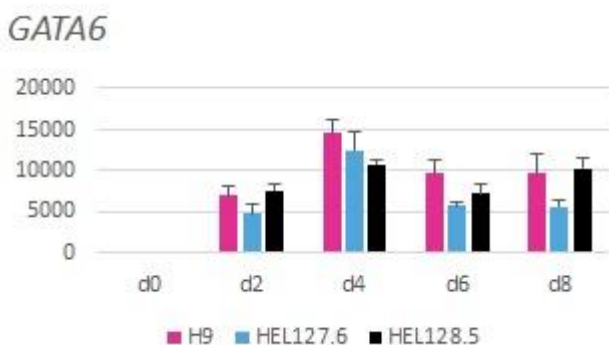
Trofoblastimerkkigeeneistä *GATA3*:n aktiivisuus on matalampaa D-protokollassa [Kuva 18] trofoblastiprotokollaan verrattuna [Kuva 6]. Ekspression huipun (päivä 2) jälkeen ilmentyminen laskee vähitellen D-protokollan erilaistuksissa. Kontrollisolulinjalla H9 ekspressio on korkeampaa kuin potilaslinjoilla, mutta kaava on sama. Geeniä *HAND1* sen sijaan ekspressoidaan suunnilleen samalla tasolla kummallakin protokollalla. D-protokollalla viljellyillä H9-soluilla ja potilaslinjan HEL127.6-soluilla huippukohta on trofoblastiprotokollan tavoin päivänä 6, HEL128.5-soluilla puolestaan päivänä 4. D-protokollalla H9-soluissa ekspressio on kumminkin korkeaa jo päivästä 2 lähtien, minkä jälkeen ekspressiotasot eivät juurikaan muutu, siinä missä trofoblastiprotokollalla nousu päivästä 2 päivään 4 on huomattavaa. D-protokollalla potilaslinjojen *HAND1*-ekspressio laskee hieman päivästä 2 päivään 6 ja nousee jälleen hieman viljelmien viimeisenä päivänä 8. Verrattaessa trofoblastiprotokollaan, potilaslinjojen *HAND1*-ekspressio puolestaan nousee solulinjalla HEL127.6 päivää 8 kohti, kun taas solulinjalla HEL128.5 muutoksia ekspressiossa ei juurikaan esiinny. Geeniä *KRT7* ei ekspressoida erilaistuneissa D-protokollan soluissa lainkaan.





**Kuva 18.** D-protokollalla viljeltyjen solujen trofoblastimerkkigeenien ekspressio eri solulinjoissa: kontrollisolulinja H9 kuvastettu punaisella pylväällä ja potilassolulinja HEL127.6 sinisellä. Etenkin *HAND1*-geeniekspressio on huomattavaa.

Alkionulkoisiin soluihin viittaavan *GATA6*:n ekspressio on D-protokollalla [Kuva 19] merkittävästi korkeampaa kuin trofoblastiprotokollassa [Kuva 8]. Ekspression huippu on päivänä 4 kaikilla solulinjoilla. Kaikilla solulinjoilla päivänä 6 ekspressio laskee hieman. HEL128.5-soluilla ekspressio hivenen kasvaa päivästä 6 päivään 8 siirryttäessä. Viimeistä päivää lukuun ottamatta geeniä *GATA6* ekspressoidaan enemmän kontrollisolulinjalla H9 kuin potilaslinjojen soluissa.



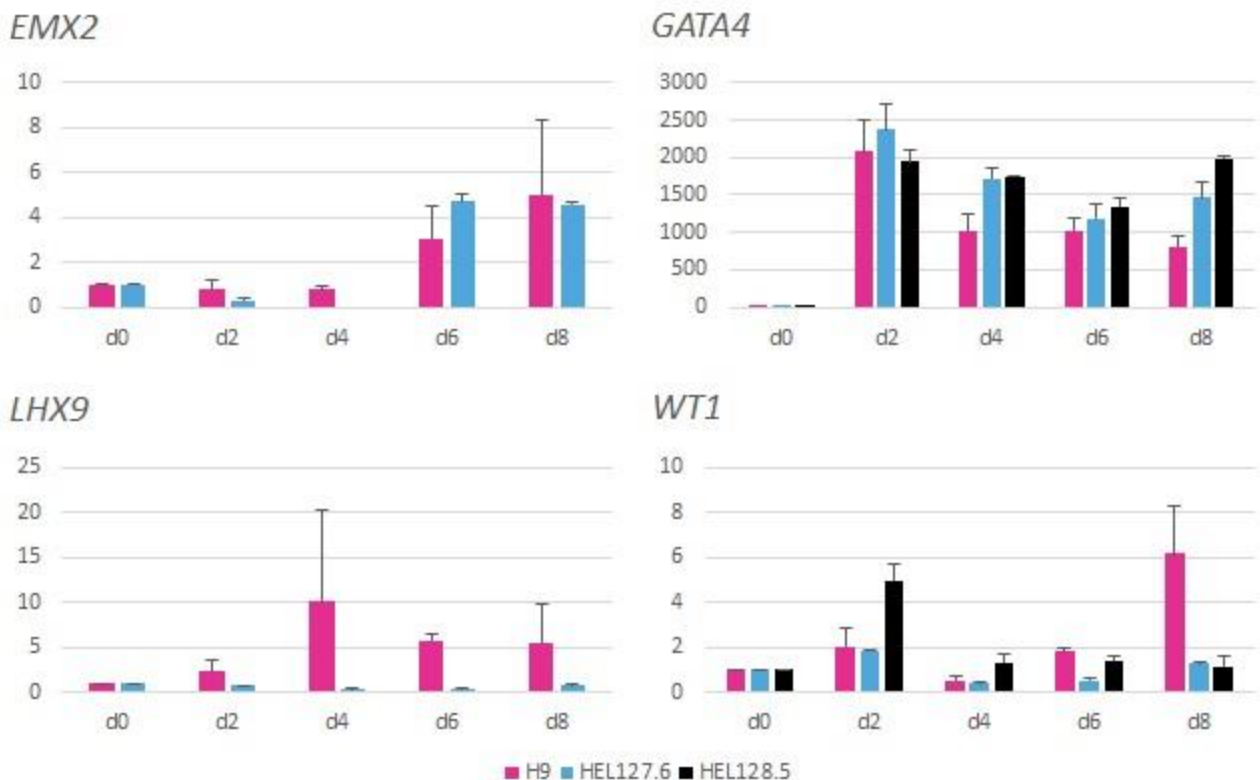
**Kuva 19.** Alkionulkoisten solujen merkkigeenin *GATA6* ekspressio D-protokollan erilaistuneissa soluissa. Ekspressio on korkeaa, etenkin päivästä 4 alkaen.

Intermediaarisen mesodermin merkkigeeneistä [Kuva 20] *LHX1*-geeniekspressio on keskimääräistä D-protokollalla. Päivänä 2 ekspressio saavuttaa huippukohdan. Eniten geeniä ekspressoidaan toisella potilassolulinjalla HEL128.5. Sen sijaan geeniä *PAX2* ekspressoidaan melko paljon, etenkin päivänä

2. Tämän jälkeen ekspressiotasot putoavat hyvin vähäiseksi. Myös *PAX2*:n ekspressio on solulinjan HEL128.5 soluissa korkeampaa kuin muilla solulinjoilla.



**Kuva 20.** Intermediaarisen mesodermin merkkigeenien ekspressio D-protokollan soluissa eri solulinjoissa: H9-solut punaisella, potilaslinjat HEL127.6 sinisellä ja HEL128.5 mustalla. Etenkin *PAX2*-tasot ovat korkeita.



**Kuva 21.** D-protokollan ekspressio bipotentiaalin sukurauhasen merkkigeeneissä. Geeneistä *EMX2* ja *LHX9* tulokset puuttuvat toisesta potilaslinjasta HEL128.5. Geenin *GATA4* ekspressio on suurta kaikilla solulinjoilla. Muiden bipotentiaalimerkkigeenien ekspressio sen sijaan jää matalahkolle tasolle.

D-protokollan soluissa bipotentiaalin sukurauhasen merkkigeenien [Kuva 21] välillä on eroja mRNA-ekspressiossa. *EMX2* ekspressoituu sekä H9-soluissa että potilaslinjalla HEL127.6 vähäisesti. Geenin *GATA4* ekspressio on puolestaan melko korkeaa päivästä 2 alkaen, minkä jälkeen tasot laskevat

vähän, HEL128.5-soluilla viimeistä päivää lukuunottamatta. Suuria eroja solulinjojen välillä eikä niiden sisällä esiinny. *LHX9*-ekspressio on sen sijaan melko matalaa. H9-soluissa ekspressiota on enemmän kuin toisella potilaslinjalla. Myöskään *WT1* ei ekspressoitu juurikaan D-protokollan soluissa. Solulinjakohtaisia eroja kuitenkin on: potilaslinjalla HEL128.5 *WT1*-ekspressio on huomattavasti muita solulinjoja korkeampaa päivänä 2, kun taas päivänä 8 ekspressiota esiintyy eniten H9-soluissa.

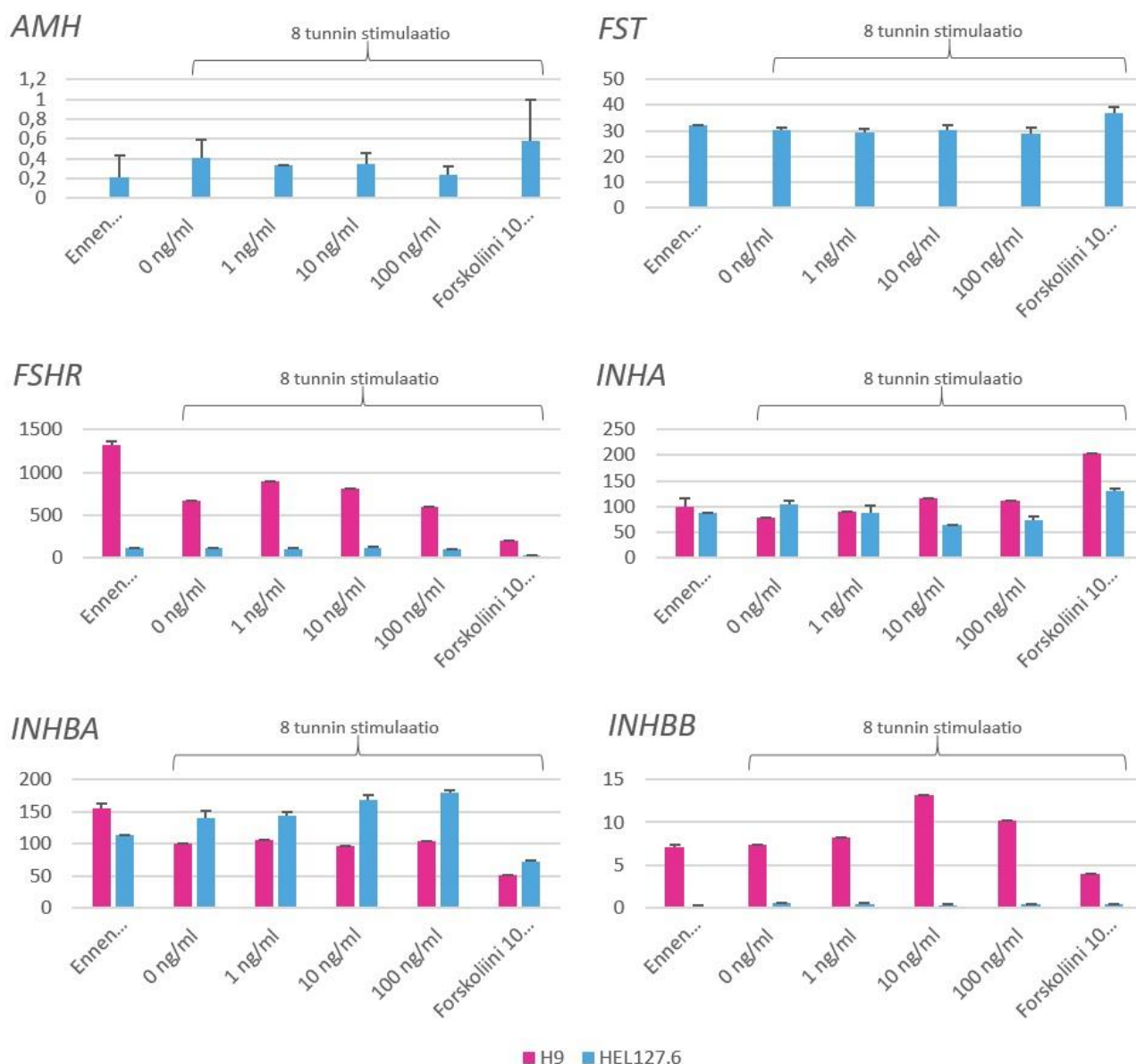
## FSH-stimulaatio

Koska molemmat protokollat tuottivat FSHR-positiivisia soluja, reseptorin toiminnallisuutta ja kykyä aktivoida cAMP-tuotantoa haluttiin tutkia FSH-stimulaatioilla.

### Trofoblastiprotokolla

FSH-stimulaation vaikutusta testattiin ensin trofoblastiprotokollan soluille [Kuva 22] viljelmien viimeisenä päivänä (d12). *AMH*-geenin (anti-Müllerian hormoni) ekspressio on lähtökohtaisesti matalaa HEL127.6-soluissa trofoblastiprotokollan soluissa päivänä 12. Verrattaessa lähtötilanteeseen eli aikapisteeseen ennen stimulaatioiden aloitusta, 8-tuntinen FSH-stimulaatio ei näyttäisi vaikuttavan *AMH*-ekspressioon. Forskoliinilla stimuloituna *AMH*-ekspressio on tuskin nähtävästi korkeampaa. Follistatiinia koodaava *FST* ekspressoituu lähtötilanteessa kohtalaisesti HEL127.6-solulinjalla, mutta ekspressiotasoissa ei näyttäisi tapahtuvan minkäänlaista muutosta eksogeenisen FSH:n tai forskoliinin johdosta. *AMH*- ja *FST*-geeneistä tulokset puuttuvat H9-solujen osalta.

*FSHR*-geenin ekspressio on H9-soluissa korkea lähtötilanteessa (ennen stimulaatiota) FSH-stimulaation suorituspäivänä eli päivänä 12, HEL127.6-soluissa puolestaan hyvin vähäistä. FSH-stimulaatioissa ei kuitenkaan ilmene FSH:n konsentraatiosta riippuvaista vaikutusta *FSHR*:n ekspressioon kummallakaan käytetyllä solulinjalla H9 tai HEL127.6. Sen sijaan forskoliinistimulaatiossa reseptorin ekspressiotasoissa on nähtävissä selkeä lasku. *INHA* (inhibiini  $\alpha$ -geeni) on ekspressoituna päivänä 12, mutta edellisten geenien tavoin FSH-stimulaatiolla ei näytä olevan juurikaan vaikutusta geenin ekspressioon. Inhibiini  $\beta$ A:ta koodaavan *INHBA*-geenin suhteen näyttäisi siltä, että HEL127.6-potilassolulinjalla FSH-stimulaatio kasvattaisi hiukan ekspressiota. H9-soluissa stimulaatiolla ei ole selkeää vaikutusta. *INHBB* (inhibiini  $\beta$ B) ekspressoituu aiempia vähemmän, eikä kahdeksan tunnin FSH-stimulaatio vaikuta ekspressioon merkittävästi. H9-soluissa näkyy kuitenkin pientä kasvua FSH:n pitoisuudella 10 ng/ml. Inhibiinejä koodaavilla geeneillä forskoliinistimulaatio johtaa FSH:sta poikkeaviin tuloksiin: *INHA*-geenin ekspressiotasot nousevat forskoliinilla etenkin H9-soluissa, kun puolestaan geenien *INHBA* ja *INHBB* ekspressiotasot laskevat forskoliinin myötä. Geenien *FSHR* ja *INHBA* kohdalla näytteissä ”Ennen stimulaatiota” ja ”0 ng/ml” on suuri poikkeama ekspressiossa, vaikka näytteiden pitäisi pitkälti vastata toisiaan.



**Kuva 22.** Trofoblastiprotokollan soluissa suoritettu 8-tuntinen FSH-stimulaatio ja sen vaikutus eri merkkigeenien ekspressioon päivänä 12. Kuvassa kaksi eri solulinjaa: kontrollisolulinja H9 (punainen) sekä potilassolulinja HEL127.6 (sininen). Vertikaaliakselilla ekspressiotasot. Horisontaalisella akselilla käytetty aikapiste ”Ennen stimulaatiota” sekä FSH-pitoisuudet 0 ng/ml – 100 ng/ml ja forskoliini 10  $\mu$ M. H9-solulinjan ekspressiotasojen tulokset puuttuvat geeneistä *AMH* ja *FST*. FSH-stimulaatioilla ei näyttäisi olevan juurikaan vaikutusta minkään geenin ekspressioon.

Trofoblastiprotokollan soluille haluttiin toteuttaa FSH-stimulaatio useampana päivänä, jotta nähtäisiin mahdolliset erot *FSHR*:n ekspressiossa eri aikapisteiden välillä ja voitaisiin arvioida optimaalisinta ajankohtaa stimulaation tekemiselle. FSH-stimulaatio toteutettiin 12-päiväisen viljelyn aikana päivinä 4, 8 ja 12 [Kuva 23]. Päivinä 4 ja 12 FSH-stimulaatio ei näytä vaikuttavan *FSHR*:n ekspressiotasoon. Päivänä 4 edes forskoliini ei näytä aikaansaavan muutosta reseptorin ekspressiossa. Sen sijaan päivänä 8 *FSHR*:n ekspressiotasot laskevat hiukan suurempaan FSH-

pitoisuuteen siirryttäessä, mutta muutos ei ole kovin selkeä. Samana päivänä myös forskoliini johtaa geeniekspression vaimentumiseen. Myös päivänä 12 forskoliinin aiheuttama lasku erottuu kuvassa.

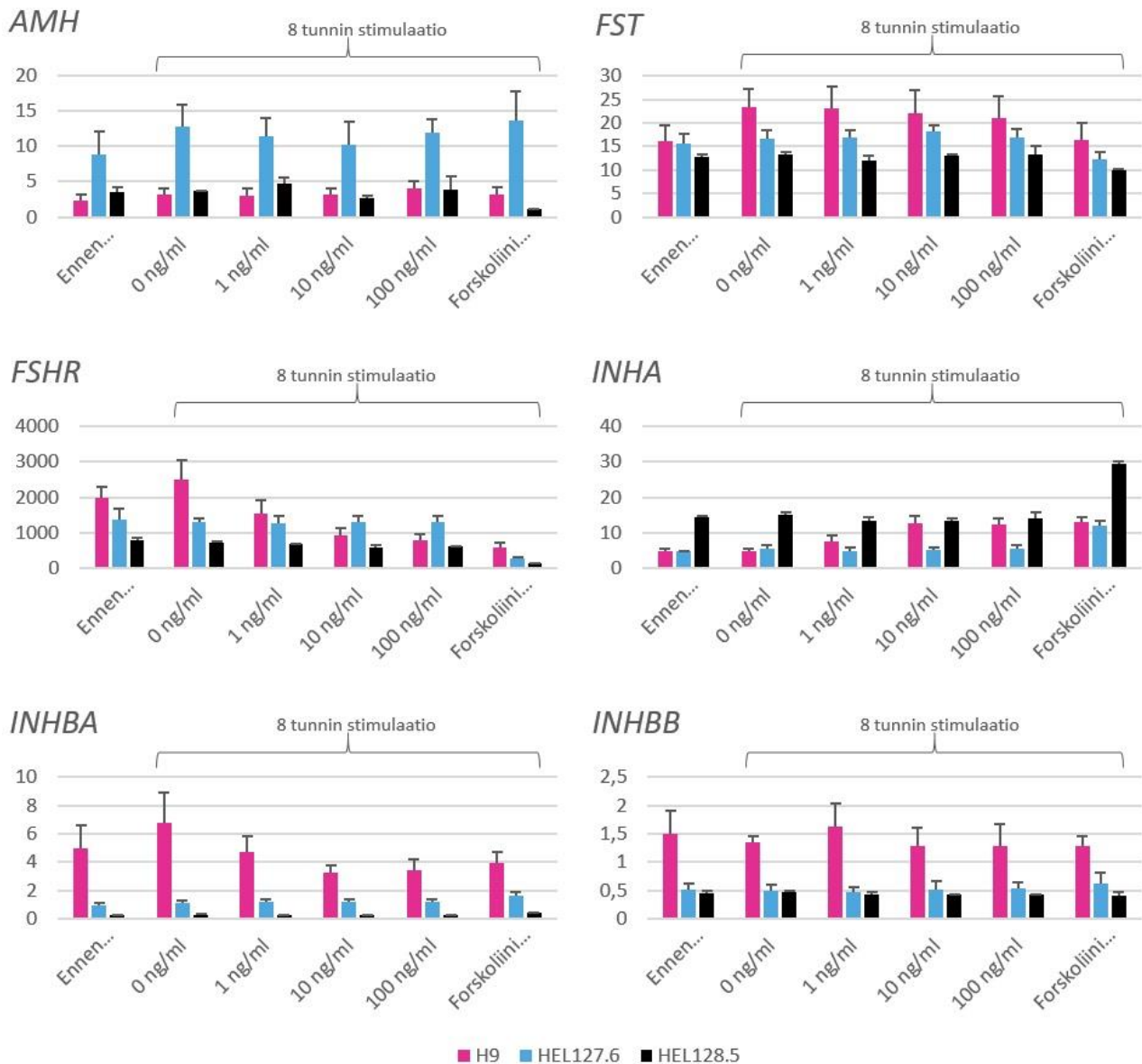


**Kuva 23.** FSH-stimulaatio trofoblastiprotokollalla viljellyissä soluissa eri päivinä: *FSHR*-ekspresso kontrollisolulinjan (H9) solunäytteissä myötä eri pitoisuuksilla. Vertikaaliakselilla Y ilmaistu ekspressiotasot, horisontaalisella X-akselilla käytetty FSH-pitoisuus ja forskoliini. Eri aikapisteet käyvät ilmi erivärisistä pylväistä: päivä 4 kuvassa haalean vaaleanpunaisena, päivä 8 tummempana vaaleanpunaisena ja päivä 12 punaisena.

### D-protokolla

Toisella protokollalla FSH-stimulaatio johtaa korostuneempiin muutoksiin geenien ekspressiotasoissa, mutta ei kaikilla tutkituilla merkkigeeneillä [Kuva 24]. *AMH*:n ekspressiossa ei tapahdu muutoksia yhdelläkään solulinjoista: potilassolulinjalla HEL127.6 ekspresso on korkeinta, mutta FSH-stimulaatio ei näytä vaikuttavan kumpaankaan suuntaan. Myöskään forskoliini ei liiemmin muuta *AMH*:n ekspressiota, joskin hyvin maltillinen lasku on nähtävissä potilaslinjalla HEL128.5. Samaten *FST*-geenin ekspresso säilyy muuntumattomana läpi FSH-stimulaation. Forskoliini vaimentaa ekspressiota aavistuksen kaikilla solulinjoilla.

Selkeä FSH:n pitoisuudesta aiheutuva muutos geenien aktiivisuudessa näkyy kuitenkin muilla tutkituilla geeneillä. Villityyppisoluissa eli kontrollisolulinjana käytetyillä H9-soluilla FSH-stimulaatio johtaa *FSHR*:n vaimennussäätelyyn eli ekspression selkeään laskuun konsentraation kasvaessa. Kummassakaan potilassolulinjassa ei ilmene ekspressiotasojen muutoksia vasteena FSH-stimulaatiolle. Forskoliini johtaa samankaltaiseen muutokseen H9-soluissa ja myös potilaslinjojen soluissa. *INHA*:n ekspresso nousee hieman H9-solulinjassa. Suurta muutosta geenin ekspressiossa ei kuitenkaan tapahdu. Potilaslinjoissa ainoastaan forskoliini johtaa muutoksiin *INHA*:n geeniekspressiossa. *INHBA*:n ekspresso laskee hieman H9-soluissa FSH-pitoisuuden kasvaessa, kun taas forskoliinilla vaikutus on vähemmän korostunut. Sen sijaan *INHBB*:n ekspressiotasoissa ei ilmene muutoksia stimulaatiossa millään tutkitulla solulinjalla, vaan ekspressiotasot säilyvät suunnilleen samanlaisena kaikilla FSH-pitoisuuksilla kullakin solulinjalla. Edes forskoliini ei näyttäisi muuttavan ekspressiotasoa kyseisellä geenillä.



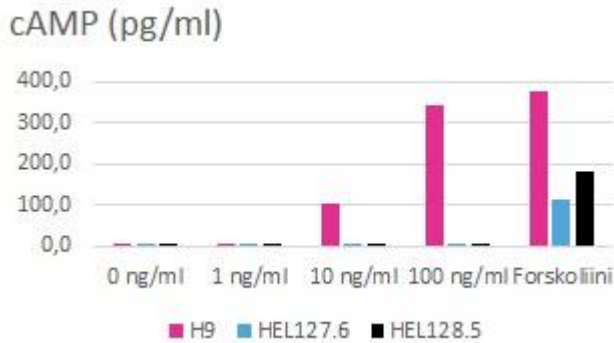
**Kuva 24.** D-protokollalla viljeltyjen solujen merkkigeenien ekspressio FSH-stimulaation myötä eri solulinjoissa: H9-solulinja (punainen), potilaslinja HEL127.6 (sininen) sekä HEL128.5 (musta). Vertikaali-akseli ilmaisee ekspressiotasot, horisontaalinen X-akseli käytetyn FSH-pitoisuuden ja forskoliinin. Palkit kuvastavat laskettua keskiarvoa  $\pm$  SEM 3-5 eri toistosta, pois lukien solulinja HEL128.5, jolla tulokset ovat peräisin yksittäisestä stimulaatiokokeesta.

## cAMP-analyysi

FSH-stimulaatioiden havaittiin johtavan muutoksiin D-protokollan solujen geeniekspressiossa, ja *FSHR*:n vaimennussäätelyn vuoksi reseptoriproteiini vaikutti toiminnalliselta. Täten soluille päätettiin suorittaa cAMP-analyysi. Tulokset ovat suhteellisia, eli ne ilmoittavat muutoksen lähtötilanteeseen. cAMP-analyysin mukaan syklisen AMP:n määrä [Kuva 25] kasvaa alkuun eksponentiaalisesti käytetyn FSH-pitoisuuden mukaan D-protokollalla viljeltyissä kontrollisoluisissa (H9). Eroa siirryttäessä FSH-negatiivisesta stimulaatioliuoksesta (0 ng/ml) matalimpaan FSH-

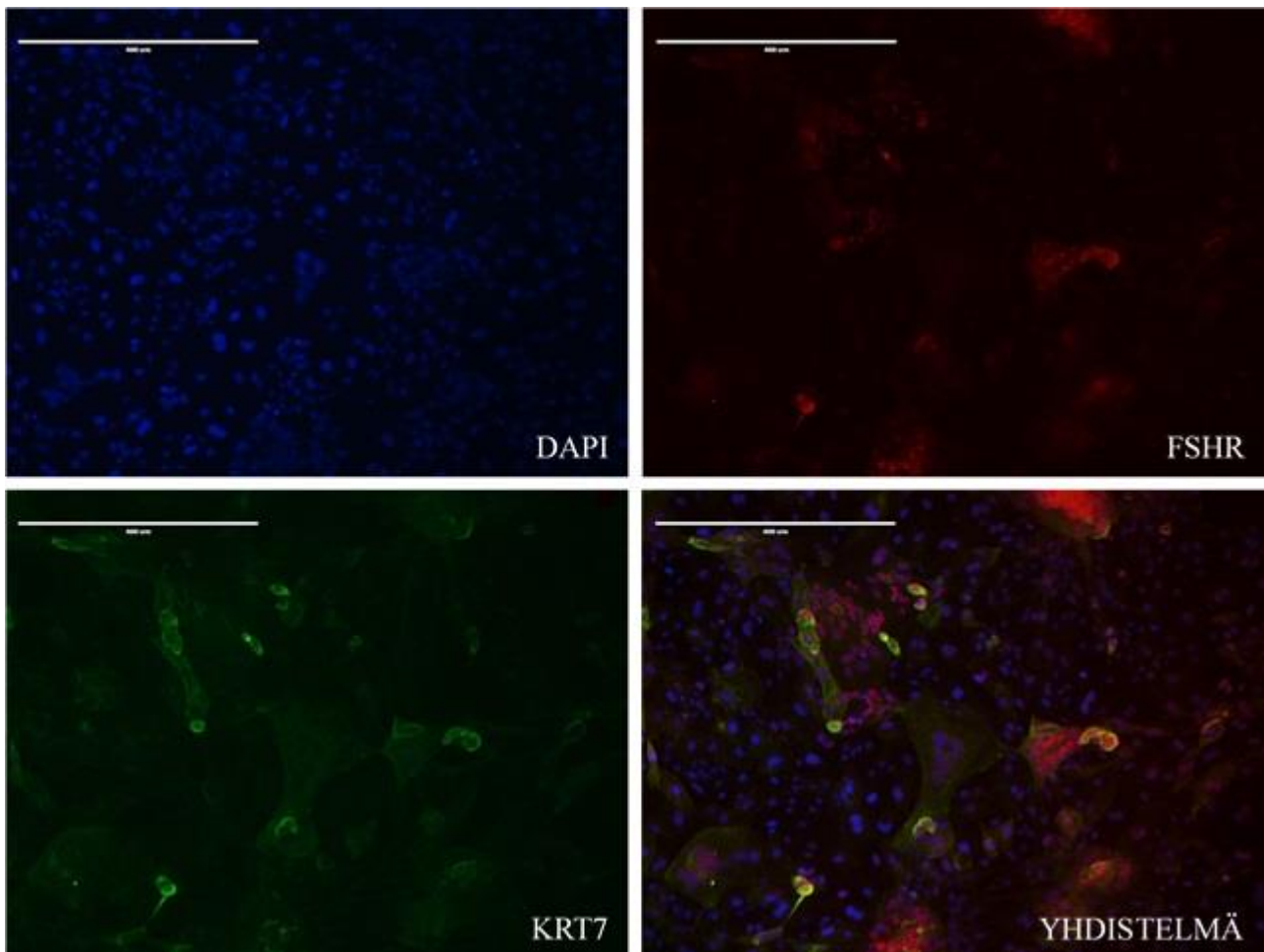


pitoisuuteen (1 ng/ml) ei vielä juurikaan ole havaittavissa, mutta tuotetun cAMP:in määrä lisääntyy huomattavasti jo FSH-konsentraatiolla 10 ng/ml. Pientä kasvua on myös korkeimmalla FSH-pitoisuudella 100 ng/ml. Potilassolulinjoihin FSH-stimulaatiolla ei ole vaikutusta. Forskoliini nostaa cAMP-tasoja kaikilla solulinjoilla, H9-soluilla enemmän kuin potilaslinjojen soluilla.



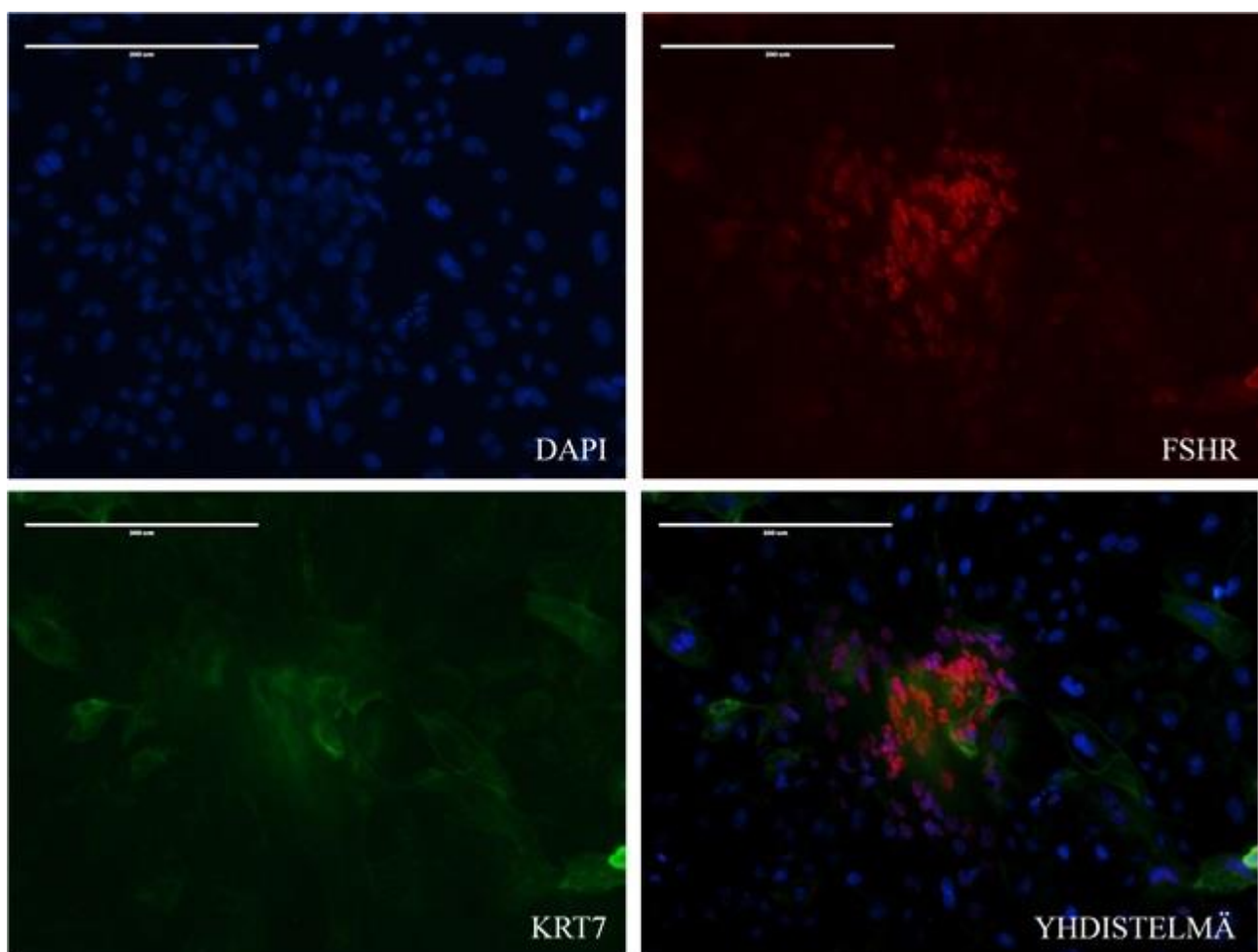
**Kuva 25.** Syklinen AMP (pg/ml) eri solulinjoilla. H9-solut punaisella pylväällä, HEL127.6 sinisellä ja HEL128.5 mustalla. cAMP:in määrä pystyakselilla, eksogeeninen FSH-pitoisuus ja forskoliini vaaka-akselilla.

### FSH-reseptorin paikantuminen solussa



**Kuva 26.** FSHR- ja KRT7-vasta-ainevärjäys fluoresenssimikroskoopilla. Trofoblastiprotokollan HEL127.6-linjan soluja päivänä 8, kymmenkertainen suurennos. Tumavärjäys sinisellä, FSHR punaisella (5 µg/ml), KRT7 (1:200) vihreällä ja yhdistelmä. Värjäysten kirkkaus ei ole kovin huomattava. Mitta-asteikko 400 µm.

Kummallakin protokollalla viljellyille soluille suoritettiin useita immunosytokemiallisia värjäyksiä eri viljelmien vaiheissa. Soluista värjättiin muun muassa FSHR sekä sytokeratiini 7 [Kuva 26 & Kuva 27]. Solut pysyivät pääpiirteittäin hyvin kiinni maljalla (sekä peitinlaseilla että ilman peitinlaseja), mutta vasta-aineesta riippuen tulosten laatu vaihtelee. Sytokeratiini 7 (KRT7) -vasta-aineella värjäykset onnistuivat poikkeuksetta hyvin. Signaali on erottuva käytetyllä laimennoksella (1:200), ja sitoutuminen ilmenee siellä, missä pitääkin eli epäspesifistä värjäytymistä ei erityisemmin esiinny. Sen sijaan FSHR-vasta-aineen kanssa on esiintynyt runsaasti ongelmia: osittain vasta-aineen sitoutuminen näyttää olevan epäspesifiä. Paikoittain sitoutumista vaikuttaa tapahtuvan jonkin verran myös tuman sisällä. Havaittavaa eroa paikantumisessa protokollien tai solulinjojen välillä ei esiinny. Parhaimmat värjäystulokset saavutettiin käyttämällä suurempaa laimennosta (5 µg/ml).



**Kuva 27.** FSHR- ja KRT7-vasta-ainevärjäys fluoresenssimikroskoopilla kuvattuna. Kuvassa trofoblastiprotokollalla viljeltyjä päivän 8 HEL127.6-potilaslinjan soluja, kaksikymmentäkertainen (20x) suurennos. Tumavärjäys sinisellä, FSHR punaisella (5 µg/ml), KRT7 (1:200) vihreällä ja yhdistelmä. Kirkkaus on hieman pienemmällä suurennoksella otettuja kuvia parempi. Mitta-asteikko kuvissa on 200 µm.



## 4. Tulosten tarkastelu

Pro gradu -tutkielmassani haluttiin perehtyä follikkelia stimuloivan hormonin reseptorigeenin (*FSHR*) ilmentymiseen pluripotenttien kantasolujen erilaistumisessa. Tavoitteena oli selvittää, minkälaisissa soluissa *FSHR*-geeniä ilmenee; onko ekspressio peräisin alkion sisäisistä vai alkion ulkopuolisista soluista. Tämän johdosta tarkasteluun valittiin trofoblastin erilaistumiseen keskittyvä protokolla ja sen rinnalle tutkimusryhmämme intermediaarisen mesodermin ja bipotentiaalisen sukurauhasen erilaistamiseen tarkoitettu D-protokolla. Kahden erilaisen soluviljelyprotokollan tulosten vertailulla oli tarkoitus saada selville, mitä erilaistuksissa syntyvät, *FSHR*-positiiviset solut ovat, mitä muita geenejä nämä solut ilmentävät ja tämän myötä tutkia, voisiko *FSHR*:llä olla jokin aiemmin tuntematon rooli varhaisessa yksilönkehityksessä.

Kudosten ja elinten kehityksessä solujen erilaistuminen on yksi tärkeimmistä perustapahtumista, ja sen myötä geenien ilmentyminen muuttuu. Tällöin erilaistunut solu poikkeaa sekä transkriptomi-profiilinsa että morfologiansa osalta niin pluripotentista alkuvaiheesta kuin myös muiden elinten ja kudosten soluista (Sariola ym. 2015; Yang ym. 2015). Geenien ja proteiinien ilmentymistä tarkastelemalla voidaan tehdä päätelmiä, mitä soluja viljelmiin on erilaistunut. Kummallakin käytetyllä protokollalla tarkasteltiin siis eri solutyypeille ominaisia merkkigeenejä.

### D-protokollan myötä erilaistunut, heterogeeninen solupopulaatio

D-protokolla, joka kehitettiin sukurauhasten somaattisten solujen erilaistamiseen, näyttäisi suuntaavan soluja useammalle kehitykslinjalle. D-protokollan soluissa ilmennetään trofoblastin merkkigeenejä, joskin huomattavasti matalammalla tasolla kuin trofoblastiprotokollan soluissa. Toisin kuin *KRT7*, joka näissä soluissa ei ekspressoitu ja *GATA3*, jonka ekspressio jää jälkeen trofoblastiprotokollan soluista, *HAND1*:n ekspressio on todella korkeaa kummallakin protokollalla. *HAND1*-geenin ilmentymistä pidetään trofoblastin erilaistumisen ohella muiden ei-trofoblastisten, alkionulkoisten solujen indikaationa (Firulli ym. 1998), minkä lisäksi geeni ekspressoituu alkiolinjaan kuuluvissa rakenteissa, kuten mesodermissä. *HAND1*:n tavoin *GATA6*:n ekspressio on todella huomattavaa. *GATA6*-geeniä pidetään yleisesti primitiivisen ja alkionulkoisen endodermin merkkigeeninä (Telugu ym. 2013). Molempia geenejä ekspressoituu muun muassa sikiökalvoissa (Knöfler ym. 2002), joiden rakentumiseen sekä trofoblastista erilaistuva alkionulkoinen ektodermi että primitiivisestä endodermistä ja epiblastista kehittyvä alkionulkoinen mesodermi osallistuvat (Roberts ym. 2004). Näiden kahden geenin ilmentyminen korkealla tasolla viittaa vahvasti alkion ulkopuolisten solujen erilaistumiseen. Mitä tulee alkiolinjan solujen erilaistumiseen, intermediaarisen mesodermin merkkigeeneistä *PAX2* sekä bipotentiaalisen sukurauhasen merkkigeeneistä *GATA4*

ekspressoituvat D-protokollalla merkittävästi. Toisaalta *GATA4*-geeni on aktiivinen muissakin alkiokudoksissa, minkä ohella sitä pidetään primitiivisen endodermin merkkigeeninä (Hyslop ym. 2005; Vallier ym. 2009). Tällöin sen ekspressio saattaa liittyä myös alkionulkoisten rakenteiden erilaistumiseen, joten sen korkeaa ekspressiota eritoten suhteessa muihin bipotentiaali-merkkigeeneihin voidaan pitää loogisena. Muita alkiolinjaan kuuluvasta erilaistumisesta kertovia geenejä ilmennetään D-protokollan soluissa korkeintaan keskimääräisellä (lähinnä *LHX1*) tai matalahkolla tasolla. Ekspressiot kuitenkin romahtavat sekä *LHX1*- että *PAX2*-geeneillä päivään 4 mennessä. Tämä on erikoista, sillä viljelyliuokseen päivänä 2 lisätyn BMP7-kasvutekijän pitäisi indusoida mesodermaalista erilaistumista (Vallier ym. 2009). Tämän voidaankin tulkita merkitsevän, että mikäli erilaistumiskokeiden alkupäiviin painottuva ekspressio *LHX1*- ja *PAX2*-geeneissä johtuu Aktiviini A:n ja CHIR-99021-kasvutekijän alku-uurretta ja mesendodermiä voimistavasta vaikutuksesta, mesendodermaalinen erilaistuminen tyrehtyy tämän jälkeen. Näin tulokset voisivat viitata primitiivisen endodermin tai suoraan alkion ulkopuolisten solujen erilaistumiseen.

Kantasolujen kehitys perustuu pitkälti pluripotenssitilan ja erilaistumisen välisen tasapainon säätelyyn. Tästä säätelystä vastaavat muun muassa kasvutekijät. Tutkimuksessa käytetyt kasvutekijät muodostavat toisiaan säätelevän verkoston, jolla on joustava, aikariippuvainen erilaistamispotentiaali ihmisen alkionkehityksessä ja solulinjan määrätymisessä (Wu ym. 2008; Zhang ym. 2008). Vaikka D-protokolla kehitettiin alkiolinjan solujen erilaistamiseen, tulokset vaikuttavat kasvuolosuhteita tarkastellessa silti johdonmukaiselta. Soluviljelyissä D-protokollan käytetyistä kasvutekijöistä Aktiviini A:n ja CHIR-99021-molekyylin tiedetään tukevan mesendodermin ja alku-uurteen muodostumista (Sudheer ym. 2012). Mesendodermin kaavoittumisen ohella esimerkiksi fibroblastikasvutekijät liittyvät myös primitiivisen endodermin kehitykseen. Vaikka FGF-signaalia ei olekaan tällä protokollalla erikseen aktivoitu, pluripotentissa kantasoluissa sitä esiintyy luontaisesti (Loh ym. 2014). Tutkimusryhmän muissa protokollissa BMP7:n on havaittu indusoivan suurella konsentraatiolla alkionulkoisia merkkigeenejä (Sepponen ym. 2017). Mutatoituneen *BMP7*-geenin tiedetään johtavan allantoiksen eli rakkokalvon sekä istukan epämuodostumiin (Rossant & Cross 2001), jolloin geenillä voi olla näiden rakenteiden kehitystä säätelevä vaikutus. *BMP7*-geenin onkin havaittu ekspressoituvan esimerkiksi alkionulkoisissa mesodermisissa ja rakkokalvossa (Solloway & Robertson 1999). D-protokollassa käytetty BMP7-pitoisuus oli 50 ng/ml, ja kuten johdannossa nousi esille, konsentraatiogradientilla voi olla hyvinkin huomattava merkitys erilaistumisen lopputuloksen kannalta. D-protokollan kokeissa erilaistuvien solujen ominaisuudet vaikuttavat tästä näkökulmasta ristiriidattomalta.

D-protokollan soluviljelyissä erilaistuvat solupopulaatiot tuskin edustavat mitään sukurauhasen kehitysvaihetta, mutta qPCR-tulosten perusteella voidaan kuitenkin päätellä, että maljoilla kasvaa useamman kehityslinjan soluja, todennäköisesti sekä alkionlinjaan kuuluvia että alkion ulkopuolisia.

D-protokolla johtaa siis heterogeenisen solupopulaatioiden muodostumiseen, jossa ilmennetään paljon useiden eri solutyypin merkkigeenejä. Alkionulkoisten merkkigeenien mittava ekspressio viittaa alkionulkoisiin soluihin, mutta tähän palataan tuonnempana.

## **Trofoblastin kaltaisten solujen erilaistuminen pluripotenteista kantasoluista**

Alkion kantasolujen kyky erilaistua trofoblastiksi on eräs kiistellyimmistä aiheista alalla (Sarkar 2013; Tiruthani ym. 2013). Alkion kantasolut ovat peräisin blastokystin sisäsolumassasta, jolla ei tutkimusten mukaan pitäisi olla enää potentiaalia muodostaa ulkosolukerrosta ja sen erilaisia trofoblastisolutyyppejä (Tarkowski ym. 2010). Eräs yleinen kritiikinaihe koskee lisäksi *in vitro* trofoblastisolujen mahdollista mesodermaalista alkuperää sekä näiden solujen verrannollisuutta *bona fide* trofoblastiin (Hemberger ym. 2010; Bernardo ym. 2011; Sarkar ym. 2016). Trofoblastisolujen erilaistumista on hankala todentaa, sillä yksinomaan trofoblastille tyypillisistä erityispiirteistä ei toistaiseksi ole yksimielisyyttä: valtaosa merkkigeeneistä esimerkiksi ilmenee joko ainoastaan tietyssä trofoblastisolutyypissä tai vaihtoehtoisesti geenin on aktiivinen muuallakin kuin trofoblastissa.

qPCR-tulosten perusteella näyttäisi siltä, että trofoblastiprotokollalla viljeltyt solut erilaistuisivat alkionulkoisiksi, mahdollisesti trofoblastin kaltaisiksi soluiksi. Tässä tutkimuksessa trofoblastia kuvastamaan käytettiin kyseiselle kudokselle tyypillisiä merkkigeenejä *HAND1*, *GATA3* sekä *KRT7*. *KRT7* eli tyypin II solutukirangan keratiini 7 on tärkeässä asemassa ainakin hiiren trofoblastin muodostuessa (Xu ym. 2002). Ihmisellä *KRT7*-geeniä ilmennetään trofoblastin invasiivisessa osassa (Borbely ym. 2014). Sitä pidetään myös yleisesti trofoblastille tyypillisenä merkkigeeninä ja luotettavana karakterisoinnin mittarina (Amita ym. 2013; Telugu ym. 2013; Lee ym. 2016). Trofoblastiprotokollan soluissa ekspressiota on selkeästi, ja ilmentymisen loppupäiviä kohti kasvavat tasot viittaavat trofoblastiseen soluerilaistumiseen. *HAND1* ja *GATA3* ilmentyvät viljelmissä hyvin korkealla tasolla, mikä tukee trofoblastin kaltaisten solujen erilaistumista. *KRT7*:n tapaan *GATA3*:n ekspressiota pidetään trofoblastille spesifisenä merkinä (Lee ym. 2016). Variaatio *HAND1*-geenin ekspressiossa, etenkin kontrollisolulinjan H9 perättäisissä kokeissa, mutkistaa kuitenkin tulkintaa. Kuvaajia tarkastellessa on vaikea sanoa, ovatko toistojen väliset erot todellisia eli erilaistuvatko solut perättäisissä toistoissa eri suuntiin. Näin voisi käydä esimerkiksi jonkin viljelyssä tapahtuneen virheen vuoksi. Toisaalta pluripotenttien solujen erilaistumispotentiaalissa esiintyy luontaisesti eroja. Muista trofoblastin tunnistukseen käytetyistä merkkigeeneistä *CDX2* ja *DLX5* ekspressoituvat ensisijaisesti ainoastaan viljelmien alkuvaiheessa, minkä jälkeen niiden ekspressiotasot lähtevät lievästi laskuun. Tämä voi olla odotettavaakin, sillä näiden geenien arvellaan olevan olennaisia tekijöitä nimenomaan varhaisen trofoblastin erilaistumisessa (Roberts ym. 2004; Shirley ym. 2012; Chen ym. 2013b). Esimerkiksi hiiren kantasoluissa *CDX2*:n tiedetään olevan merkityksellinen alkion ja alkionulkoisten linjojen määräytymisessä: geenin on havaittu ekspressoituvan jo 8- ja 16-

soluvaiheen tsygootissa (Strumpf ym. 2005; Ralston & Rossant 2008; Jedrusik ym. 2015). Erityisesti *CDX2*:n käyttöä trofoblastin merkkigeeninä on kuitenkin kritisoitu, sillä trofoblastin ohella sitä ilmennetään muun muassa kaikissa alkiolehtien solulinjoissa (Bernardo ym. 2011; Loh ym. 2014).

Tämän tutkielman trofoblastierilaistuksissa syntyneiden solujen karakterisaatioon voisi soveltaa tutkimuksen ulkopuolelle jääneiden merkkigeenien tutkimista. Esimerkiksi *ELF5*-geeni on tärkeä transkriptiotekijä ainakin hiiren trofoblastin erilaistumisessa (Ng ym. 2008). *ELF5*:n metylaatioilla näyttäisi olevan suuresti vaikutusta trofoblastin erilaistumiseen (Roper & Hemberger 2009; Giakoumopoulos & Golos 2013). *In vivo* istukkakudoksessa *ELF5*:n promoottorialue on valtaosin hypometyloituneena (Lee ym. 2016), joten metylaatiokuviot olisi hyvä tutkia erilaistuneista soluista, ja bisulfiittisekvensoinnin voisi suorittaa jopa useammassa aikapisteessä. Huomionarvoista voisi olla myös esimerkiksi *HLA-G*:n ja *hCG-β*:n ekspression tutkiminen soluista tai esimerkiksi viljelynesteiden hormonipitoisuuden (etupäässä hCG, progesteroni ja estradioli) selvittäminen, mikä voisikin osaltaan jouduttaa solujen tunnistamista.

### **Ravinneliuoksen ihanteellinen vaihtoväli**

Omassa tutkimuksessani trofoblastiprotokollan ravinneliuoksen vaihtovälin testaus ei tutkittujen merkkigeenien perusteella vielä ratkaissut optimaalisinta aikaa ravinneliuoksen vaihdolle. Trofoblastille tyypillisistä merkkigeeneistä *GATA3*:n ekspressiotasoihin ravinneliuoksen vaihtovälillä ei vaikuta olevan suurta vaikutusta. *HAND1*-ekspressio sen sijaan on korkeampaa, kun ravinneliuos vaihdettiin normaalisti joka päivä. Varhaisista trofoblastin merkkigeeneistä *CDX2*:n ekspressio on *HAND1*:n tapaa korkeampaa normaalilla ravinneliuoksen vaihtovälillä. *DLX5*:n ekspressio puolestaan on huomattavasti korkeampaa päivänä 4, kun ravinneliuos oli vaihdettu soluille vain joka toinen päivä. Seuraavassa ajanmittauspisteessä erot ovat tasaantuneet.

Tutkittujen merkkigeenien ekspressiot eivät eroa merkittävästi näytteissä eri ravinneliuoksen vaihteluväleillä, mutta varovaisen tulkinnan mukaan normaali jokapäiväinen vaihto tuottaa paremmat tulokset. Alkionulkoisilla merkkigeeneillä jokapäiväinen ravinneliuoksen vaihto johtaa korkeampaan geeniekspressioon, mutta tällöin myös esimerkiksi alkiolinjan solujen erilaistumisesta kertova *GATA4*-geeni ekspressoituu korkeammin. Taustalla saattaa olla aineenvaihdunnallisia syitä, kuten endogeenisten kasvutekijöiden tuoton muutokset tai metaboliittien kertyminen. Muissa merkkigeeneissä ravinneliuoksen vaihtotaajuus ei aiheuta selkeitä eroja, eli valtavan suurta merkitystä ravinneliuoksen vaihdon yleisyydellä ei vaikuttaisi olevan.

### **Muiden solujen erilaistuminen trofoblastiprotokollalla ja protokollan optimaalisuus**

Useimmat trofoblastin merkkigeenit ilmentyvät trofoblastin ohella muissakin soluissa (Lee ym. 2016), eli yhden geenin ekspression merkittäväkään nousu ei vielä merkitse trofoblastin

erilaistumista. Erilaistumisen varmistamiseksi nousu tulee olla nähtävissä muissakin trofoblastigeeneissä. Erilaistumisen myötä ei-toivottujen geenien ekspressiotasot on lisäksi tarkastettava muiden solulinjojen erilaistumisen poissulkemiseksi. Tämän johdosta trofoblastiprotokollan soluista analysoitiin myös muiden kudosten yleisiä merkkigeenejä. BMP4-kasvutekijä saattaa johtaa alkuuurteen ja mesodermin erilaistumiseen (Yu ym. 2011), mutta *BRA*-geenin matala ekspressio todennäköisesti merkitsee, etteivät solut erilaistu alkuuurteen tai mesendodermin suuntaan. Ekspressiossa on nähtävissä tuskin havaittava nousu päivänä 2 (ja sekin yksin solulinjalla HEL127.6). Myöskään endodermin erilaistumisesta kertova *FOXA2* tai neuroektodermaalinen merkkigeeni *SOX1* eivät ilmenny trofoblastiprotokollan soluissa. Muun muassa sydämen ja haiman kehityksen indikaattori ja bipotentiaalinen sukurauhasen merkkigeeni *GATA4*:n ekspressiotasot nousevat aavistuksen aivan viljelyn alkupäivinä, mutta laskevat sitten tuskin huomattavalle tasolle. Pluripotenssitekijä *OCT4*:n ekspressiotasot lähtevät välittömästi laskemaan alkupäivien jälkeen, mikä varmistaa erilaistumisen myötä tapahtuvan pluripotenssin vähenemisen. *OCT4*-geenin korkea ekspressio saattaa ehkäistä trofoblastin muodostumista (Shi & Jin 2010), eli kyseisen geeniekspression vaimentuminen viimeistään mahdollistaa olosuhteet trofoblastin kaltaisten solujen erilaistumiselle. Ei-trofoblastisten merkkigeenien tutkimisen myötä voidaan melko varmasti sanoa, että trofoblastiprotokollalla ei erilaistu ainakaan alkioelinjaan kuuluvia soluja. Täten tulosten perusteella erilaistumista vaikuttaisi tapahtuvan ainoastaan erilaisten alkion ulkopuolisten kehityslinjojen suuntaan.

Kuten sanottua, *HAND1* on sekä trofoblastin kuin muidenkin alkionulkoisten solujen merkkigeeni. Samoin kuin D-protokollan soluissa, trofoblastiprotokollalla *HAND1*-geeni ilmentyy todella runsaasti, joten on mahdollista, että trofoblastin kaltaisten solujen ohella viljelmiin erilaistuu ei-trofoblastisia, alkionulkoisia soluja. Tätä tukisi *GATA6*:n ilmentyminen melko korkealla tasolla, sillä sitä pidetään primitiivisen endodermin ja alkionulkoisen endodermin merkkigeeninä (Telugu ym. 2013). Primitiivisen endodermin tiedetään eroavan alkionkehityksen aikana muusta sisäsolumassasta. Myöhemmin sekä osa primitiivisestä endodermista että osa epiblastista erilaistuneesta alkionulkoisesta mesodermista muodostavat sikiökalvoja (Roberts ym. 2004). Sekä *HAND1* että *GATA6* ekspressoituvat yleisesti sikiökalvoissa. Toisaalta *GATA6*:n on todettu ekspressoituvan vakaasti niin ikään *in vivo* istukkakudoksessa ja/tai muissa HLA-G-positiivisissa soluissa (Telugu ym. 2013).

Alkionulkoisten rakenteiden merkkigeeneistä *AFP* ei ekspressoidu trofoblastiprotokollan soluissa, mutta *SOX7*-geeni sen sijaan ilmentyy soluissa. *AFP* ja *SOX7* tunnetaan myöhäisen alkionulkoisen endodermin merkkigeeneinä (Zhang ym. 2008). *SOX7* liittyy pohjimmiltaan alkionkehityksen säätelyyn, minkä ohella se ilmentyy esimerkiksi hypoblastissa, primitiivisessä endodermisissa ja endoteelisoluissa (Futaki ym. 2004; Zhang ym. 2009; Vallier ym. 2009). Geenin ilmentyminen

kohtalaisella tasolla viittaa osaltaan alkionulkoisten, ei-trofoblastisten solujen erilaistumiseen trofoblastin kaltaisten solujen joukkoon.

Tulokset vaikuttavat olevan sopusoinnussa viljelyolosuhteiden kanssa, joten tulkinta alkionulkoisten solujen erilaistumisesta ei välttämättä ole liian kaukaa haettua. Trofoblastiprotokollassa käytetyn BMP4:n on todettu – etenkin pitkäkestoisella käsittelyllä (Zhang ym. 2008) – indusoivan muun muassa niin primitiivisen endodermin kuin alkionulkoisen endoderminkin erilaistumista (Vallier ym. 2009; Drukker ym. 2012). Eräässä tutkimuksessa BMP4-kasvutekijän todettiin johtavan tämän tutkielman tulosten tavoin vaiheittain varhaisten trofoblastimerkkigeenien (muun muassa *CDX2*) sekä myöhäisen alkionulkoisen endodermin merkkigeenien (*SOX7* ja *AFP*) ekspressoitumiseen (Zhang ym. 2009). Endogeeninen Aktiviini/Nodal-signaali saattaa alku-uurteen ja mesendodermin kaavoittumista tehostavan vaikutuksensa johdosta erilaistaa esimerkiksi juuri primitiivistä endodermia soluviljelmiin. Olisikin mielenkiintoista nähdä, miten esimerkiksi Aktiviini/Nodal-signaalin estämiseen tarkoitetun A83-01-inhibiittorin lisääminen viljelyliuokseen muuttaisi lopputulosta. Eräiden tutkimusten mukaan BMP4:n kyky indusoida trofoblastin erilaistumista voi olla jopa suoraan riippuvaista Aktiviini/Nodal-signaalintireitin inhiboimisesta (Wu ym. 2008). Tämän tutkielman trofoblastiprotokollassa Aktiviinia ei inhiboitu, joten viimevuotisten tutkimusten perusteella protokolla ei ole optimaalisin mahdollinen trofoblastin kaltaisten solujen erilaistamiseksi. Protokollan julkaisseessa tutkimuksessa kyseinen kasvutekijäyhdistelmä tuotti kuitenkin parhaimmat tulokset (Koel ym. 2017), joten tutkielmassani ei lähdetty tekemään protokollaan muutoksia.

Toisaalta käytänteet esimerkiksi fysiologisten kasvuolosuhteiden tai välttämättömien kasvutekijöiden valinnassa vaihtelevat. Merkittävä osa trofoblastin erilaistamiseen pyrkivistä tutkimuksista keskittyy soluviljelyprotokollissaan BMP4-signaalin aktivoimiseen (Das ym. 2007; Amita ym. 2013; Yang ym. 2015), mutta eräässä tutkimuksessa on sovellettu BMP4-signaalin inhibitiota ja raportoitu trofoblastista fenotyyppiä (Sarkar ym. 2013). Kasvutekijöistä tiedetään, että ne säätelevät kehitystä ja erilaistumista eri vaiheissa eri tavalla, välillä inhiboiden ja välillä aktivoiden, joten täydellistä yhteisymmärrystä tavoite kudoksen erilaistumisesta ei välttämättä voida täysin saavuttaa. Myöskään kaikkia kasvuolosuhteiden osa-alueita, esimerkiksi valo- tai happitasojen vaikutusta, ei ole standardoitu. Useissa tutkimuksissa hypoksialla on todettu olevan suuri vaikutus linjojen määräytymiseen; matalan happitason on todettu muun muassa vaikeuttavan trofoblastin erilaistumista (Telugu ym. 2013; Soncin ym. 2015). Eri laboratorioissa suoritettujen tutkimusten keskinäistä vertailua hankaloittavat epästandardinmukaiset olosuhteet, kuten juuri poikkeavat viljelykäytännöt. Lukuisat trofoblastitutkimukset soveltavat viljelyä syöttösoluilla (hiiren alkion fibroblastit, MEF-solut) ja sen mukaisesti ravinneliuos on näille syöttösoluille optimoitua (syöttösoluille sovitettu ravinneliuos, FCM). Lisäksi useissa tutkimuksissa käytetään *embryoid bodyja* vaihtoehtoisena

viljelytapana yksikerrosviljelmille. Tällöin kirjallisuudessa esiintyviä menetelmiä tai tuloksia ei voi luonnollisesti käyttää suoraan vertailussa toisenlaiseen viljelytapaan pohjaavalle tutkimukselle.

Kiistelty aihe pluripotenttien kantasolujen kyvystä erilaistua alkionulkoisiksi, muun muassa trofoblastin soluiksi tai näiden solujen vastaavuus *in vivo* soluihin ei ole vaikuttanut saavan ratkaisua (Roberts ym. 2014), eikä tämän tutkielman pohjalta selkoa tilanteeseen voi valitettavasti odottaa. Todennäköistä on, että tutkimuksessa käytetty trofoblastiprotokolla johtaa jonkin keinotekoisien, heterogeenisten solupopulaation syntyyn. Solut ilmentävät piirteitä erilaisista alkionulkoisista rakenteista, mutta tuskin muistuttavat ainakaan yksinomaan aitoa hormonaalisesti aktiivista ja invaasiokapasiteettia ilmentävää trofoblastikudosta. Soluviljelyolosuhteissa saavutetaan vain ani harvoin yksittäisen solutyypin yhtenäistä erilaistumista (Xu ym. 2002), sillä parhaimmillaankin soluviljelyolosuhteet vain mukailevat aitoa yksilönkehitystä. Esimerkiksi *in vivo* trofoblastin erilaistuminen on tarkkaan riippuvaista muun muassa raskausvaiheesta sekä kiinnittymisestä maternaalisiin kudoksiin (Shahbazi ym. 2016), eikä näiden tekijöiden korvaaminen ole kovin yksinkertaista.

Tutkimusryhmämme tutkimusaihe rajautuu sukurauhasten kehitysbiologian tutkimukseen ja siten alkion solujen erilaistamiseen. Näin ollen tarkoituksena ei niinkään ollut kehittää optimaalista trofoblastiprotokollaa, vaan tutkia *FSHR*:n ilmentymistä pluripotenttien solujen erilaistuessa eri kehityslinjien suuntaan.

## ***FSHR*-ekspression alkuperä**

Toisin kuin D-protokolla, jolla erilaistettujen solujen tiedettiin ennestään olevan *FSHR*-positiivisia, trofoblastiprotokollan solujen mahdollisesta *FSHR*-ekspressiosta ei ollut olemassa ennakkoon havaintoja. Eräässä tutkimuksessa LH-reseptorin ekspressiotasojen oli todettu nousevan trofoblastin erilaistuessa alkion kantasoluista (Xu ym. 2002). Loogisesti vaikutti mahdolliselta, että ekspressiota voisi esiintyä tällöin myös kovin homologisella *FSHR*:llä.

Trofoblastiprotokollan soluerilaistuksissa *FSHR*-ekspressiotasojen havaittiinkin nousevan erilaistumisen myötä. Reseptorin ilmentyminen kasvaa samansuuntaisesti trofoblastin merkkigeenien kanssa, mutta tämä ei vielä suoraan tarkoita, että *FSHR*-signaali olisi välttämättä peräisin juuri trofoblastin kaltaisista soluista. D-protokollassa trofoblastiset merkkigeenit eivät ole juurikaan ekspressoituneita, mutta näissä soluviljelmissä *FSHR*:n ilmentyminen on trofoblastiprotokollaan verrattuna moninkertaista. Molemmat protokollista johtavat alkionulkoisten merkkigeenien korkeaan ekspressioon, mutta kuten *FSHR*:n ilmentyminen, D-protokollan soluissa näiden geenien ekspressio on korkeampaa. Tulokset viittaavat täten siihen, että *FSHR*:n ekspressio olisi molemmilla

protokollilla peräisin erilaistuneista alkionulkopuolisista soluista. Tämän tulkinnan mukaan *FSHR*:llä ei siis olisi roolia trofoblastin erilaistumisessa, mutta sillä saattaa olla merkitystä muiden alkionulkoisten solujen kehityksessä.

Viimevuotisissa tutkimuksissa *FSHR*:n on huomattu ilmentyvän raskauden aikana alkion ulkopuolisissa kudoksissa, joten tämän osalta tulkinta vaikuttaa johdonmukaiselta. *FSHR*-ekspressiota on havaittu kehittyvässä istukassa *in vivo* jo 8-10 raskausviikolta alkaen (Stilley ym. 2014a). Istukan lisäksi *FSHR*:n on havaittu ilmentyvän suonikalvon nukkalisäkkeiden endoteelissa läpi raskauden (Radu ym. 2010). Kohtalainen signaali on löydetty lisäksi nukkalisäkkeiden sidekudoksista (Stilley ym. 2014a). Alkuraskauden näytteissä *FSHR* paikannettiin immunohistokemiallisin värjäyksin suonikalvon viereisen desiduan eli katokalvon soluihin. Myös maternaalisten verisuonten endoteelisolut olivat positiivisia, trofoblastien ympäröimä verisuonten sisus puolestaan ei. Trofoblastisoluista ekspressiota ei löytynyt Stilleyn ym. (2014a) tutkimuksissa missään raskausvaiheessa, joskin on otettava huomioon, että tutkimuksessa mainittiin ensimmäisen tutkitun näytteen olevan raskausviikoilta 8–10. Hieman myöhemmillä raskausviikoilla *FSHR*:n havaittiin leimautuvan ulomman vesikalvon eli amnionin epiteelisoluihin sekä sidekudoksen fibroblasteissa, joissa *FSHR*-geeni oli ekspressoituna myös loppuraskauden näytteissä. Vesikalvon ja suonikalvon välinen interfaasi oli positiivinen *FSHR*:lle kaikissa raskausvaiheiden näytteissä. Puolivälissä raskautta *FSH*-reseptoria löydettiin lisäksi maternaalisesta desiduaasta eli katokalvosta ja maternaalisten verisuonten endoteelisoluihin (Stilley ym. 2014a). Raskausajan loppua kohden *FSHR*-geeniä ekspressoitiin vesikalvon uloimman kerroksen epiteelisoluihin sekä sidekudoksen fibroblasteissa. Maternaalinen katokalvo sidekudoksineen ja verisuonten endoteeleineen oli aiempien viikkojen näytteiden tavoin *FSHR*-positiivinen. Myöhemmillä viikoilla ja synnytyksen jälkeen otetuissa näytteissä napavaltimon endoteelissa ja sileissä lihassoluissa havaittiin *FSHR*-ekspressiota, samoin monissa muissa napavaltimon soluissa ja fibroblasteissa. Stilleyn ym. (2014) tulokset saavutettiin enimmäkseen vasta-ainevärjäyksillä, jotka kertovat ainoastaan proteiinitasosta. Tutkimuksessa todettiin, että yksin vasta-ainevärjäyksillä on mahdoton sanoa mitään *FSHR*-proteiinin koosta tai mRNA-ekspressiosta. Esimerkiksi ihmisen napaverisuonen endoteelisoluihin ekspresoidun *FSH*-reseptorin havaittiin olevan silmukointivariantti, josta puuttuu eksoni 9 (Stilley ym. 2014b).

Maternaalisen katokalvon solujen ilmentämää *FSHR*-ekspressiota raskauden puolivälin näytteissä pidettiin tutkimuksessa erityisen huomionarvoisena, sillä tähän aikaan tapahtuu aktiivista maternaalisten kierrevaltimoiden muokkausta (Stilley ym. 2014a). Kuten johdannossa mainittiin, tästä muokkauksesta vastaavat trofoblastisolut (Goldman-Wohl & Yagel 2002). *FSHR*-positiivisuus ei ilmennyt maternaalisten suonten sisäpinnan soluissa yhtenäisesti, vaan välillä ekspressiota havaittiin ja välillä ei (Stilley ym. 2014a). Tämän epäyhdenmukaisen ekspression tulkittiin



korreloivan verisuonten uudelleenmuokkauksen kanssa. Invasiiviset trofoblastisolut vastaavat alkion ankkuroimisesta kohdun seinämään implantaation yhteydessä, jolloin trofoblastisolut tunkeutuvat kohdun limakalvon lihasseinämään ja maternaalisiin verisuoniin, alkaen korvata suonten sisäpinnan endoteelia (Steinberg & Robins 2016). Korvaamalla suonten endoteelisolukerrosta ne muuttavat kohtuun johtavien suonten rakennetta paremmin läpäiseväksi. Tämä johtaa lisääntyneeseen verenvirtaukseen, minkä myötä kaasujenvaihto ja ravinteiden siirtyminen helpottuu (Sarkar ym. 2013). Näytteistä, joissa maternaalisten suonten endoteelia ei ollut jäljellä, ei myöskään löytynyt FSH-reseptoria (Stilley ym. 2014a). *FSHR*-geenillä siis tuskin on roolia trofoblastin erilaistumisessa, mutta trofoblastin vaiheittaisella kehityksellä vaikuttaisi yllättäen olevan epäsuora vaikutus FSH-reseptorin ilmentymiseen.

Trofoblasti myös myötävaikuttaa implantaation jälkeen sikiökalvojen muodostumiseen. Korion eli nukallinen suonikalvo on sikiökalvoista uloin. Trofoblastista erilaistuva alkionulkoinen ektodermi osallistuu sen muodostumiseen (Roberts ym. 2004; Inman & Downs 2006; Roberts & Fisher 2011) yhtymällä alkionulkoisen mesodermin kanssa, joka puolestaan erilaistuu osin epiblastista ja osin primitiivisestä endodermista (Rossant 1995; Drukker ym. 2012). Trofoblastiprotokolla johtanee ainakin osittain trofoblastin kaltaisten solujen erilaistumiseen (ja tämän johdosta trofoblastimerkkigeenien ekspressioon). Soluviljelmiin vaikuttaa erilaistuvan näiden ohessa myös muita alkion ulkopuolisia soluja, joko suoraan protokollan ”vuotamisesta” johtuen tai trofoblastivälivaiheen kautta: pluripotentti solu → trofoblastin kaltainen solu → alkionulkoinen ektodermi → suonikalvo. Tämä teoria on kuitenkin kaikessa kaavamaisuudessaan epätodennäköinen.

Stilleyn ym. (2014a) tulosten mukaan *FSHR*-proteiinia on läsnä monentyypisissä soluissa, jotka liittyvät naaraan lisääntymiselimistöön. Raskauden aikana *FSHR*-geeniä ekspressoidaan siis paitsi kehittyvässä istukassa myös napanuorassa ja useimmissa sikiökalvoissa. Mikä merkitys tällä raskaudenaikaisella FSH-reseptorilla sitten on?

*FSHR*:n ilmentymisellä tiedetään olevan merkitys blastokystin kiinnittymiselle eli implantaatiolle. Sekä hiiren että ihmisen preimplantaatiovaiheen alkioissa on havaittu *FSHR*-ekspressiota, millä on arveltu olevan merkitystä tsygootissa tapahtuvan meioosin päättymiselle ja alkion varhaiskehitykselle (Patsoula ym. 2003). Muissa hiirellä tehdyissä tutkimuksissa on havaittu, että FSH:n ja LH:n erityksen häiriöt, siis seerumin poikkeukselliset hormonitasot, altistavat implantaation epäonnistumiselle (Agrawal ym. 2012). Myös ihmisillä *FSHR*-polymorfismeja pidetään yleisenä riskitekijänä toistuville implantaatiohäiriöille hedelmöityshoitoihin osallistuvilla naisilla (Boudjenah ym. 2014). FSH:n on todettu kiihdyttävän suonien syntyä ja kehitystä VEGF:n eli verisuoniston sikiön aikaista kasvua ja kehitystä säätelevän kasvutekijän tavoin (Stilley ym. 2014b). *FSHR* osallistuu istukan verisuonituksen kehitykseen, lisäten verenvirtausta äidiltä sikiölle. Sama tarkoitus

on trofoblastisolujen verisuonten muokkauksella (Sarkar ym. 2013). Normaaali istukan verisuonitus on välttämätöntä aineiden siirtymiselle sekä sikiön kasvulle ja kehitykselle, ja tällöin riittämätön verisuonitus korreloi niin alkiokuolleisuuden, kasvurajoitusten kuin raskausmyrkytystenkin kanssa (Barut ym. 2010). *FSHR* onkin tunnistettu synnytyksen ajoitukseen vaikuttavaksi geeniksi ihmisillä (Plunkett ym. 2011). Myös geneettisesti muunnelluilla hiirillä inaktivoituneen fetoplasentaalisen *Fshr*:n on todettu johtavan istukan kehityksen hidastumiseen ja alkion kasvurajoituksiin (Stilley ym. 2014a). Nykytiedon perusteella on mahdollista teoretisoida myös ei-maternaalisen FSH-reseptorin ja maternaalisen FSH-erityksen vuorovaikutuksesta, ja tähän palaan myöhemmin.

Etenkin istukasta ja sikiökalvoista löydetty *FSHR*-ekspressio tukisi teoriaa joidenkin tuntemattomien, alkion ulkopuolisten solujen erilaistumisesta. Tämän puolesta puhuu myös *GATA6*:n ja *HAND1*:n korkea ekspressio. Tutkielmani soluviljelyprotokollat johtavat todennäköisesti kumpikin alkionulkoisten solujen erilaistumiseen ja näiden solujen ilmentämään *FSHR*-signaaliin. Koska D-protokollan soluissa *FSHR*:n ilmentyminen on moninkertaista, todennäköisesti D-protokollan myötä näitä alkionulkoisia soluja syntyy enemmän. Korkea ekspressio varhaisessa vaiheessa viittaa *FSHR*:n regulatiivisiin funktioihin. Näillä alkionulkoisilla soluilla saattaa olla piirteitä esimerkiksi sikiökalvojen tai napanuoran rakenteista, ja *FSHR*:n tiedetään ilmentyvän *in vivo* kummassakin kudoksessa (Stilley ym. 2014a). Esimerkiksi napanuora erilaistuu alkion ulkopuolisesta mesodermista, joka osallistuu myös sikiökalvojen rakentumiseen (Roberts ym. 2004; Fong ym. 2010). *FSHR*:n korkea ekspressio solujen erilaistumisessa voisikin liittyä edellämainittujen rakenteiden kehityksen myötä esimerkiksi verisuonten muodostumiseen. Kuten D-protokollan solupopulaatioita käsittelevässä kappaleessa avattiin, alkionulkoisten solujen erilaistuminen on kummallakin protokollalla hyvinkin mahdollista. Sekä endogeenisellä FGF-signaaloinnilla että Aktiviini/Nodal-signaaloinnilla on yhteys primitiivisen endodermin muodostumiseen (Zhang ym. 2009; Sudheer ym. 2012). Protokollien soluviljelyssä BMP-signaalointia on lisäksi aktivoitu BMP4- ja BMP7-kasvutekijöillä, joista ainakin BMP4:n tiedetään indusoivan myös primitiivistä endodermia (Vallier ym. 2009) sekä verisuonten endoteelin ja sikiökalvoista nukkakalvon ja rakkokalvon merkkigeenien ekspressiota (Drukker ym. 2012). BMP7-kasvutekijän on BMP4:n tavoin havaittu lisäävän alkionulkoisten merkkigeenien ekspressiota (Sepponen ym. 2017), millä voi olla merkitystä alkionulkoisten rakenteiden säätelyssä. BMP7 on samaten kytketty korkeaan *FSHR*-ekspressioon (Shi & Jin 2010).

*FSHR*-geeniekspression vaimentuminen erilaistuskokeiden loppua kohden herättää kysymyksiä. Reseptoreiden määrän tiedetään vähenevän solukalvolla, kun soluja stimuloidaan FSH:lla, mutta mitä oikeastaan pitäisi tapahtua tavallisissa erilaistuksissa ilman eksogeenista stimulaatioita? Aiemman tutkimustiedon puuttuessa on hankala arvioida, onko lasku odotettua vaiko peräti ongelma. H9-solulinjassa *FSHR*:n mRNA-ekspressio putoaa päivänä 6 saavutetun huipun jälkeen melko

korostuneesti kummallakin soluviljelyprotokollalla, samoin ensimmäisellä potilaslinjalla HEL128.5. Toisella potilaslinjalla HEL127.6 *FSHR*-ekspressio on edelleen melko korkea päivänä 8, eikä seuraavina päivinä yhtä matala kuin kahdella muulla solulinjalla. Viljelyiden kesto (12 päivää) ei anna viitteitä millaista kehitys olisi tämän jälkeen: HEL128.5-potilaslinjalla *FSHR*-ekspression taso esimerkiksi hiukan nousee taas päivästä 10 päivään 12 siirryttäessä. Toisella potilaslinjalla (HEL127.6) ekspressio putoaa hiukan, H9-kontrollisoluilla puolestaan jälleen enemmän. Tältä pohjalta olisi tärkeää selvittää, mitä muita tekijöitä häviää samaan aikaan *FSHR*-ekspression kanssa. Tällöin olisi ehkä mahdollista määrittää, mikä tekijä ylläpitää *FSHR*:n ekspressiota solujen erilaistuessa.

*FSHR*-geeniä ilmentävien solujen prosentuaalisesta osuudesta on toistaiseksi mahdotonta tehdä arviota. Virtaussytometriaa yritettiin suorittaa solujen lajittelemiseksi, mutta analyysia ei saatu lopulta tehtyä käytännön ongelmien vuoksi. Parhaillaan tutkimusryhmässä on käynnissä yritys *FSH*-ligandin spesifisestä leimaamisesta konjugoiduilla fluoroforeilla *FSHR*-positiivisten solujen erottelemiseksi. Nykyisten tulosten perusteella signaali vaikuttaa olevan peräisin toistaiseksi määrittelemättömistä alkion ulkopuolisista soluista, joita erilaistuu merkittävästi tehokkaammin D-protokollan viljelyissä. Jotta reseptorin paikantumisesta erilaistuneisiin alkionulkoisiin soluihin voitaisiin varmistua lopullisesti, *FSHR*-proteiini pitäisi onnistuneesti leimata yhdessä alkionulkoisten merkkigeenien tuottamien proteiinien kanssa, ja saada nämä paikantumaan samoihin soluihin.

### ***FSHR*-proteiinin lokalisaatio**

Tutkielmani värjäystuloksissa on runsaasti laadullista vaihtelua vasta-aineiden välillä. *FSHR*-värjäystulokset vaikuttavat ristiriitaiselta varsinkin siltä osin, että vasta-aine näyttää värjäyskuvin paikantuvan tuman sisälle, ja ilmiö on nähtävissä kaikilla solulinjoilla. Erityisen mielenkiintoiseksi asian tekee, että vasta-aine näyttäisi kulkeutuvan solun sisään tumaan silloinkin, kun permeabilisaatiota eli solukalvon lävistämistä ei ole tehty.

Havaintoja tumansisäisestä ja soluliman vesikkeleihin keskittyvästä paikantumisesta on tehty myös muissa tutkimuksissa (Baccetti ym. 1998). Tiedetään, että *FSH*:n sitoutuminen käynnistää reseptorin internalisoitumisen, mutta tutkimuksessani reseptori paikantuu solun sisälle jopa ligandin puuttuessa. Reseptorit syntetisoidaan tietysti muiden proteiinien tapaan solun sisällä, mutta tumansisäinen sitoutuminen ei oikein vaikuta ymmärrettävältä. Tuskin on myöskään tarkoituksenmukaista, että reseptori ilmentyisi fenotyyppisesti eri osissa solua eri solutyypeissä. *FSHR* on tietävästi solukalvoreseptori. Asian varmistamiseksi lähdin etsimään UniProt-tietokannan avulla *FSHR*:n transkripteista kohde- tai signaalipeptidiä eli proteiinin ”osoitelappua”. Kyseessä on yleensä aminopäässä sijaitseva 3–70 aminohapon mittainen sekvenssi, joka ohjeistaa proteiinien kuljetusta synteesin jälkeen oikealle paikalleen solun sisällä. Tarkoitus oli vertailla tietokannasta selvitettyä

signaaliptidiä jonkin hyvin tunnetun kalvoproteiinin signaaliptidiin; mikäli ne vastaisivat suurin piirtein toisiaan, tämä antaisi lisää viitteitä proteiinin kohdistumisesta. Vertailin alkuun FSHR:n signaaliptidiä LHR:n vastaavaan BLAST-työkalun avulla. 17 aminohapon mittaisesta FSHR-sekvenssistä ja 26 aminohapon mittaisesta LHR:sta FSHR:n signaaliptidistä aminohapot 2–9 vastaavat 63 % LHR:n kohtaa 7–14. Esimerkiksi munasarjojen solukalvolla sijaitsevaan Integriini  $\alpha 6$ -proteiiniin vertailu tuotti jo 83 % positiivisen tuloksen. Tietokantojen pintapuolinen tutkiminen ei riitä horjuttamaan käsitystä reseptorin kalvolle keskittyvästä sijainnista. Reseptorien puuttuessa kalvolta FSH-ligandi ei voi sitoutua eikä viestinvälitys käynnisty, mikä saattaa olla *FSHR*-mutaatioista johtuvien signaalinvälityksen ongelmien taustalla.

Mitä tulee vasta-aineiden sitoutumiseen, tarkalleen ei tiedetä millaisia fenotyyppitason eroja *FSHR*-mutanttilinjojen soluissa kuuluisi ilmetä suhteessa villityypin kontrollisolulinjaan. ECD-alueelle osuvan mutaation tiedetään vaurioittavan reseptoriproteiinin kuljetusta solukalvolle, josta reseptorit joko puuttuvat kokonaan, ilmentyvät harvalukuisina tai muuten heikommalla sitomiskapasiteetilla. Tällöin voisi tietysti kuvitella, että solunsisäinen vasta-ainesitoutuminen olisi juuri seurausta pistemutaation aiheuttamista kuljetushäiriöistä ja jumiin jäämisestä solun sisään. Teoria ei kuitenkaan selitä, miten vasta-aine kulkeutuu solun sisään ilman permeabilisaatiota. On epäselvää, voisiko vasta-aineen sitoutuminen kalvolla olevaan reseptoriin johtaa reseptorin internalisoitumiseen kuten hormonin sitoutumisessa tapahtuu. Tällöin solunsisäisen sitoutumisen tulisi näkyä ainoastaan potilaslinjojen soluissa. *FSHR*-värjäyksiä toteutettiin useita kertoja kaikilla solulinjoilla, mutta tulokset eivät näyttäneet poikkeavan solulinjojen välillä, eikä *FSHR*-signaalin esiintymisessä ilmennyt tulkittavaa eroa. Kaikkiaan värjäyksiä toteutettiin useammalla erilaisella kaupallisella vasta-aineella, ja sitoutuminen oli liki poikkeuksetta epäspesifistä. *FSHR*-vasta-aineiden kanssa onkin raportoitu runsaasti epäspesifisiä värjäystuloksia. Tämä osaltaan lisää epäilystä vasta-aineiden toimivuudesta. H9-solujen värjäyskuvien heikkolaatuisuus johti jättämään kuvat pois tutkielmasta, joten mahdollisten solulinjojen välisten erojen demonstroimiseksi värjäyksiä olisi hyvä toteuttaa uudemman kerran eri solulinjoilla. Lisäksi värjäyksiä tehtiin pääasiallisesti trofoblastiprotokollan soluille, joten jatkossa painotus olisi D-protokollan soluissa, jossa ekspressio oli voimakkaampaa ainakin mRNA-tasolla. Parhaiten toiminutta vasta-ainetta, jota käytettiin tämän tutkielman värjäyskuviin, on ollut saatavilla kuitenkin vain pienen testierän verran.

Ristiriitaisten vasta-ainevärjäyskuvien vuoksi *FSHR*:n paikantamiseen solussa tulisi saada selvennys. Tutkimusryhmässä on sittemmin käyty keskustelua muun muassa yliekspressiotutkimuksista, joita voitaisiin käyttää apuna vasta-aineita testattaessa. Vasta-aineen epäspesifinen sitoutuminen ja mahdolliset epäluotettavat positiiviset tulokset vaikeuttavat turhaan tutkintaa.

## D-protokollan kontrollisoluissa toiminnallinen FSHR-proteiini

Molempien protokollien soluissa todettiin esiintyvän *FSHR*:n ekspressiota, mutta FSH-stimulaatiotulosten mukaan reseptori on toiminnallinen ainoastaan D-protokollalla viljellyissä villityypin kontrollisoluissa (H9-solulinja). D-protokollassa *FSHR*:n ekspressio laskee, kun FSH-pitoisuus kasvaa. Tämä on linjassa kirjallisuuden kanssa, sillä tutkimusten perusteella tiedetään, että *in vivo* reseptorien määrä putoaa eksogeenisen FSH-stimulaation myötä (Lussiana ym. 2008; Tranchant ym. 2011; Ulloa-Aguirre ym. 2013). Toisaalta esimerkiksi Stilleyn ym. (2014b) artikkelissa todetaan, että eri kudoksissa FSH-reseptorin vasteherkkyys vaihtelee.

FSH:n sitoutuminen reseptoriinsa laukaisee reseptorin interaktion G-proteiinin kanssa, joka kofaktoriin (guanisyylitriposfaatti eli GTP) sitoutumalla aktivoi adenylaattisyklaasin toimintaa (Lussiana ym. 2008). Adenylaattisyklaasi puolestaan käynnistää toisioähetin, syklisten AMP:n valmistuksen. cAMP:in kertyminen johtaa proteiinikinaasi A -aktivaatioon, mikä puolestaan säätölee geenien ilmentymistä fosforyloimalla molekyyliä cAMP:in vaste-elementtien (CRE) välityksellä. FSH-ligandin tarkoitus on siis johtaa solun sisällä aineenvaihdunnallisiin muutoksiin ja/tai CRE-vaste-elementtiä kantavien geenien (tässä erityisesti *FSHR*) aktivoitumiseen tai vaimentumiseen. Toistuvan FSH:lle altistumisen tiedetään johtavan asteittain reseptorin vähenevään vasteeseen eli desensitisaatioon, mikä näkyy reseptorin vaimennussäätelynä (Lussiana ym. 2008). Konkreettisesti tämä merkitsee, että *FSHR*-proteiinin syntetisoiminen vähenee ja FSH-reseptorien määrä solukalvolla laskee. Tämä johtuu todennäköisesti reseptorien internalisaatiosta ja sulkemisesta lysosomeihin FSH-stimulaation jälkeen. Stimulaation vaikutuksen kumuloituminen on nähtävissä vielä 24 tuntia myöhemmin sekundaarisena vaimennussäätelynä, jolloin *FSHR*:n proteiinisynteesi laskee entisestään. Matalan FSH-annostelun tulisi tutkimusten mukaan johtaa RNA-tasojen ja FSH-reseptorien määrälliseen kasvuun, korkean FSH-annostelun puolestaan vaimennussäätelyyn ja vähentyneeseen reseptorimäärään (Lussiana ym. 2008). Toisaalta, tämä teoria on peräisin tutkimuksista *in vivo* sukurauhasen fysiologian parissa. Tutkimustietoa ei tietävästi ole siitä, tapahtuuko reseptorin säätely sukurauhasten ulkopuolella – tai *in vitro* -soluissa – samoilla kriteereillä. Tämän tutkielman FSH-stimulaatiotulokset osoittavat nimittäin, että reseptorin mRNA-ekspressio laskee jo matalalla FSH-annostelulla. Kun verrataan pitoisuuteen 0 ng/ml (stimulaatioliuoksessa ei FSH-ligandia), FSH-pitoisuus 1 ng/ml laskee *FSHR*:n geeniekspressiota todella huomattavasti. Tulokset on suhteutettu näytteeseen, joka on otettu ennen stimulaatioiden aloitusta, ja tuloksia vertaillaan aina kontrolligeeniin, mutta prosenttiyksikköinä muutos lähentelee neljääkymmentä. Suhteellinen ero 1 ng/ml ja 10 ng/ml välillä on kutakuinkin yhtä suuri. Sen sijaan 10 ng/ml ja 100 ng/ml ero ei ole enää kovin merkittävä. Mitä sitten tulee annostelun suuruuteen ja stimulaatioaikaan, optimaalisuutta on vaikea arvioida. Fysiologisesti FSH-pitoisuudet 1 ng/ml tai 10

ng/ml eivät välttämättä ole matalia pitoisuuksia, kenties stimulaatioita voisi kokeilla toteuttaa vieläkin matalammilla laimennoksilla. Stimulaation kestoakin voisi kokeilla muuttaa.

Teoriassa FSH-reseptorin vaste matalampiin FSH-pitoisuuksiin voisi olla johdonmukaista juuri varhaisessa yksilönkehityksessä. *FSHR*-geenillä on rooli implantaatiossa ja verisuonituksen kehittymisessä (Stilley ym. 2014a), ja on ehdottoman tärkeää, että invaasioprosessi pysähtyy ajoissa. Kohtuun tunkeutumiseen ja invaasioon liittyvän verisuonituksen muokkauksen tulee tapahtua oikeaan aikaan ja oikeassa suhteessa; pintapuolinen invaasio ei mahdollista perusteellista ankkurointia, kun taas liian syväälle, jopa myometriumiin eli kohdun lihaskerrokseen ulottuva nukkalisäkkeiden työntyminen voi johtaa vakaviin raskauskomplikaatioihin (*placenta accreta*). Näin voisi olla mahdollista, että alkion ulkopuolisten solujen FSH-reseptorit reagoivat maternaaliseen kiertävään follikkelia stimuloivaan hormoniin, ja täten invaasio pysähtyy sopivalla hetkellä, kun äidin plasman hormonimolekyylit alkavat päätyä kosketuksiin invasiivisen kudoksen kanssa. Tällöin myös olisi perusteltua, että alkion ulkopuolisen kudoksen FSH-reseptoreilla olisi suurempi affiniteetti FSH:n sitomiseen, ja täten vaste maternaaliseen FSH-eritykseen tapahtuisi jo pienillä pitoisuuksilla. Tämä voisi toteutua esimerkiksi erilaisten *FSHR*:n silmukointivarianttien kautta tai mahdollisesti solunsisäisen signaalintiketjun muuntuneella toiminnalla. Aiheesta ei ole tutkimustuloksia, joten tämä on pitkälti arvailua.

Erikoista tulosten tarkastelussa on ero kontrollinäytteen ("Ennen stimulaatiota") ja 0 ng/ml -näytteen välillä. Näytteet on otettu lähes välittömästi peräkkäin, ja ainoastaan viljelyliuosten "tuoreus" erottaa ne toisistaan. 0 ng/ml -näytteen soluille vaihdetaan viljelyliuos stimulaatiokokeen alkaessa, kun taas "Ennen stimulaatiota" -näyte on peräisin soluista, jotka ovat kasvaneet samassa viljelyliuoksessa edellisestä viljelyliuoksen vaihdosta lähtien. Esimerkiksi H9-soluilla *FSHR*:n geeniekspressio on korkeampaa näytteessä "0 ng/ml" kuin "Ennen stimulaatiota", eli vaikuttaa siltä, että jokin ekspressiota hillitsevä tekijä poistuu, kun viljelyliuos vaihdetaan. Tämä voi mahdollisesti perustua jo pelkästään happipitoisuuden muutokseen tai muihin fysikaalisiin tekijöihin.

Trofoblastiprotokollan soluissa FSH-stimulaatio (viljelyliuoksena 0 ng/ml, johon verrattiin eri FSH-konsentraatioliuoksia) ei vaikuttanut muuttavan tutkittujen geenien ilmentymistä juuri lainkaan edes villityypin kontrollisoluissa. Yleensä FSH-stimulaatiot tuottavat selkeän vasteen 10 ng/ml tai 100 ng/ml pitoisuudella annosteltuna. *FSHR*:n ekspressiossa näkyy vähäinen kasvu FSH-pitoisuuden ollessa 1 ng/ml, suuremmilla pitoisuuksilla ekspressio taas hiipuu. Muista tutkituista geeneistä *INHBA*:n ekspressiossa näyttäisi tapahtuvan maltillista kasvua HEL127.6-solulinjalla, joskin tulosten ristiriitaisuuden vuoksi niitä ei voi kuitenkaan pitää luotettavana. Kontrollilinjalla *INHBB*:n ekspressiossa näyttäisi tapahtuvan pieni piikki pitoisuudella 10 ng/ml, mutta erot ovat silti tuskin huomattavia. Miehen elimistössä inhibiini  $\beta$  on tunnistettu FSH-riippuvaiseksi parametriksi

(Kamischke ym. 2001), jolloin solujen tulisi reagoida FSH-stimulaatioihin. Tutkielman iPS-linjat ovat peräisin naispotilailta, eikä tietoa vastaavista eroista sukupuolten välillä juuri ole. Vasteen puuttuminen trofoblastiprotokollan soluissa herättää pohtimaan, olisiko jokin mennyt kokeen toteutuksessa pieleen, mutta tulokset ovat yhdenmukaisia useammassa perättäisessä toistossa. Eikö reseptoreita ilmene riittävästi viljelmien solujen kalvolla, vai eivätkö näiden solujen reseptorit ole toiminnallisia? Trofoblastiprotokollan soluissa stimulaation ihanteellista ajankohtaa seulottiin jopa kolmessa eri aikapisteessä (päivinä 4, 8 ja 12), joten stimulaation väärästä ajoituksesta ei pitäisi olla kyse. FSH-stimulaation kesto oli jokaisella kerralla 8 tuntia, joten voi olla mahdollista, että stimulaatiot kestävät liian pitkään tai liian vähän aikaa. D-protokollan soluissa vaikutus kuitenkin näkyy 8 tunnin FSH-stimulaatioissa, ja tämän ohella tutkimusten mukaan FSH-stimulaatio vaikuttaa soluissa jo alkaen 1–4 tunnista aina 24 tuntiin saakka (Lussiana ym. 2008). Onkin todennäköisempää, että trofoblastiprotokollalla erilaistuneet solupopulaatiot tai näiden solujen reseptorit ovat jollain tapaa viallisia. Kenties mRNA-ekspressiosta huolimatta proteiinia ei vain tuoteta soluissa tai proteiinisynteesissä esiintyy jonkinasteinen viive.

Toisaalta tiedetään, että muun muassa parakriiniset tekijät säätelevät *FSHR*:n ilmentymistä. Esimerkiksi Aktiviini ja TGF- $\beta$  indusoivat reseptorin ekspressiota, EGF, IGF1 sekä FGF puolestaan repressoivat ekspressiota, säädellessä siten solujen vasteherkkeyttä (Lussiana ym. 2008). Käytetty ravinneliuos poikkeaa trofoblastiprotokollassa D-protokollan vastaavasta. Sen lisäksi että DMEM/F-12-pohjaliuos on erilainen, kunkin 12 päivän ajan soluille annostellaan FGF-inhibiittoria. Teoria voi olla epätodennäköinen, mutta ilman lisätutkimusta ei voi todeta, etteikö PD173074-reseptoriantagonisti tai jokin muu ravinneliuoksen tekijä voisi vaikuttaa trofoblastiprotokollan FSH-reseptoreihin tai esimerkiksi peittää FSH-stimulaatioiden vaikutusta. Eräiden tutkimusten mukaan myös BMP-signaaloinnin on todettu vaikuttavan *Fshr*:n mRNA-ekspressiota vaimentavasti rotan granuloosa- ja granuloosatumorisoluissa (Otsuka ym. 2001; Miyoshi ym. 2006). Vaimentava vaikutus voi tietysti olla lajikohtaista tai koskea vaikkapa vain tiettyjä BMP-ligandeja. Primaariviljelmien solujen käyttäytyminen voi myös poiketa erilaistuvista kantasoluista. Toisaalla muun muassa BMP7:n on nimenomaisesti todettu kasvattavan *FSHR*-ekspressiota (Shi & Jin 2010). Tämän tutkielman D-protokollan alkuinduktiossa käytetyllä BMP7:lla tuskin on enää vaikutusta *FSHR*-ekspressioon, jonka huippu on pääsääntöisesti päivänä 6 ja FSH-stimulaatiokin vasta päivänä 8. Trofoblastiprotokollassa sen sijaan BMP4-kasvutekijää annostellaan soluille joka päivä ravinneliuoksen vaihdon yhteydessä, joten mahdollisuutta BMP-signaaloinnin inhibitorisesta vaikutuksesta tuskin voidaan suoraan sulkea pois. Tämän tulisi näkyä siten mRNA-tasoissakin, ja kaiken kaikkiaan trofoblastiprotokollan soluissa *FSHR*-ekspressio onkin matalampaa kuin D-protokollalla.

Forskoliinistimulaatio aiheuttaa muutoksia useiden tutkielmassa tarkasteltujen geenien ekspressiossa. Kuten todettua, forskoliini on FSH:n tavoin adenylaattisyklaasin aktivaattori, eli se kykenee käynnistämään cAMP:in valmistuksen ATP:sta (Lussiana ym. 2008). Forskoliini ei kuitenkaan kulkeudu soluun FSH-reseptorin kautta. Forskoliinin tulisi johtaa muutoksiin geenien ekspressoitumisessa myös potilaslinjoilla, minkä vuoksi forskoliini toimii hyvin positiivisena kontrollina FSH-stimulaatioissa ja cAMP-mittauksissa. Koska forskoliinistimulaatiossa ilmenee useimpien geenien kohdalla ekspressiotason muutoksia kummallakin soluviljelyprotokollalla, stimulaatioiden tuloksia voidaan pitää luotettavana.

cAMP-analyysin tulokset vahvistavat tulkinnan D-protokollan soluissa ilmennetyn *FSHR*:n toiminnallisuudesta. FSH:n sitoutumisen tiedetään aktivoivan reseptoria, ja signaalinvälityksen tarkoitus on johtaa toisiolähetin eli syklisen AMP:n muodostumiseen ATP:stä (Katritch ym. 2013). Tuotetun syklisen AMP:n määrä nouseekin lähes 17-kertaiseksi kun FSH-pitoisuutta kasvatetaan 1 ng/ml → 10 ng/ml. Pitoisuuteen 100 ng/ml siirryttäessä cAMP-tuotanto kolminkertaistuu, eli matalammilla konsentraatioilla saavutettu eksponentiaalinen kasvu muuttuu lineaariseksi FSH-pitoisuuden noustessa mahdollisesti jo liian korkeaksi. FSH:n ohella useat muutkin hormonit aktivoivat cAMP:ia adenylaattisyklaasientsyymien avulla. Koska cAMP-tuotanto kasvaa samalla kun eksogeenisen FSH:n pitoisuus kasvaa, kertoo se nimenomaan GPCR-aktivaatiosta, viitaten toimivaan FSH-reseptoriin (Trehan ym. 2014).

## Solulinjaerojen tulkintaa

*FSHR*-mutaatiota kantavat potilassolulinjat osoittautuivat erilaistuvan pääpiirteittäin samalla tapaa kuin villityypin kontrollisolut (H9). Silti eroavaisuuksia geeniekspressiossa ilmenee. Muun muassa geenien *HAND1* ja *GATA6* kohdalla variaatio solulinjojen välillä on suurta. Esimerkiksi kontrollisolulinjalla (H9) *GATA6*:n ekspressio ei laske loppupäiviä kohti, toisin kuin kahdella potilaslinjalla. Todennäköisesti poikkeama ekspressioissa johtuu juuri solulinjakohtaisista eroista, eikä niinkään poikkeavista erilaistumisen lopputuloksista. Trofoblastiprotokollan soluviljelyissä tutkittujen geenien ekspressio on melko yhtenäisesti korkeampaa H9-soluissa kuin potilaslinjoissa HEL127.6 tai HEL128.5. Poikkeuksia on geenien *KRT7* ja *DLX5* kohdalla. Etenkin loppupäiviä kohden *KRT7*:n ekspressio on potilaslinjoissa H9-soluihin nähden moninkertaista, ja ekspressio kasvaa vielä kokeen viimeisinä päivinä. Sama kaava on nähtävissä toisellakin potilaslinjalla, joskin HEL127.6-solulinjalla ekspressio on korkeinta.

D-protokollan soluviljelyissä solulinjojen väliset erot ovat ehkä aavistuksen vähemmän korostuneita. Pääsääntöisesti mRNA-ekspressiota vaikuttaa esiintyvän edelleen eniten H9-solulinjassa, mutta kontrasti ei ole yhtä selkeä. Intermediaarisen mesodermin merkkigeenit ekspressoituvat



potilaslinjassa HEL128.5 korkeimmalla tasolla. Päiväkohtaisia eroja on lisäksi bipotentiaalisen sukurauhasen merkkigeenissä *WT1*, jonka ekspressio H9-solulinjassa nousee hieman kokeen viimeistä päivää kohden, potilaslinjassa HEL127.6 ei kokeen aikana tapahdu merkittäviä muutoksia, ja toisella potilaslinjalla HEL128.5 ekspression huippupäivästä 2 eteenpäin vähäinenkin ilmentyminen häviää.

Kuten todettua, D-protokollan viljelyissä H9-soluissa näkyy vaste eksogeeniselle FSH-stimulaatioille, mutta potilaslinjat eivät vaikuta tuottavan minkäänlaista vastetta. Potilaslinjoissa ilmenee tällöin FSH-stimulaatioissa nähtävä funktionaalinen ero kontrollina käytettyyn H9-solulinjaan, jolla FSH-stimulaatio käynnistää reseptorin selkeän vaimennussäätelyn. Potilassolulinjoissa ekspressoitu *FSHR* ei vaikuta tuottavan toiminnallista proteiinia kummallakaan käytetyllä soluviljelyprotokollalla, sillä mRNA-ekspressio ei takaa proteiinin toiminnallisuutta. Tämä on johdonmukaista potilaslinjojen kantaman pistemutaation vuoksi, sillä kirjallisuuden mukaan inaktivoivan Ala189-mutaation vuoksi reseptorien toiminta on valtaosin salpautuneena. Tutkimuksissa on todettu, että FSH-ligandin sitoutumisen kinetiikka on mutatoituneessa reseptorissa sinänsä normaali: mutaatio ei nimittäin kohdistu FSH:n interaktioon reseptorinsa kanssa tai hormoni-reseptori-kompleksin muodostumiseen (Vaskivuo ym. 2002). Mutaation seurauksena reseptoreiden laskostumisessa esiintyy vaurioita, jolloin kuljetus solukalvolle saattaa häiriintyä (Doherty ym. 2002; Rannikko ym. 2002). Täysin yksiselitteinen asia ei kuitenkaan ole. Joidenkin tutkimusten mukaan solukalvolla ilmenee mutaatiosta johtuen normaalia alhaisempi määrä reseptoreita (Rannikko ym. 2002), toisten mukaan reseptorien määrä on normaali, mutta niiden toimintakyky on heikentynyt (Lussiana ym. 2008). Syystä riippumatta Ala189Val-mutaatio vaurioittaa FSH:n sitomisen jälkeistä signaalinvälitysketjua, heikentäen reseptorin kykyä aktivoida toisioähetin synteesiä (Rannikko ym. 2002). Näin FSH-stimulaation tuloksista ilmenevä selkeä ero kontrollisolujen ja potilaista peräisin olevien mutanttisolujen välillä vahvistaa H9-soluissa endogeenisesti ekspressoituvan FSH-reseptorin funktionaaliset ominaisuudet, mikä kiistatta lieneekin tämän tutkielman tärkein löydös.

Indusoidut pluripotentit kantasolut ovat yleinen väline tautipatologian ja biolääketieteen tutkimuksessa. Täyttä selvyyttä ei ole siitä, mitä aikuisen yksilön somaattisille soluille tapahtuu uudelleenohjelmoinnissa, kun solut pakotetaan takaisin pluripotenssitilaan. Tautimallinnusten tuottaman tutkimustiedon perusteella kuitenkin tiedetään, että mutaatiot säilyvät läpi uudelleenohjelmointiprosessin. Tutkimusten mukaan indusoidut pluripotentit kantasolut vastaavat teknisiltä ominaisuuksiltaan alkion kantasoluja (Takahashi & Yamanaka 2006), mutta usein käyttäytyvät eri tavalla. Selkeästi jo tämän tutkielman tuloksia tarkastellessa voidaan huomata, että käytetyt solulinjat (kaksi HEL-potilaslinjaa ja kontrollisolulinja H9) tuottavat toisinaan erilaisia tuloksia. Osa tutkimuksista puoltaakin teoriaa, jonka mukaan lähtökudos saattaa vaikuttaa erilaistumiseen jossain määrin säilyvien, epigeneettisten poikkeamien kautta (Ohi ym. 2011; Nazor

ym. 2012). Erillisiä solulinjoja ei voikaan täydellisesti verrata toisiinsa. Saman solulinjan sisällä perättäiset siirrostusnumerotkin saattavat tuottaa poikkeamaa erilaistumattomiin lähtösoluihin, ja tämä erilaisuus vain korostuu, kun puhutaan täysin eri solulinjoista, jotka ilmentävät omanlaisiaan ominaispiirteitä ja erilaistumispotentialiaa. Vaikka potilaslinjojen kantama mutaatio on samaa tyyppiä (homotsygoottinen, inaktivoiva Ala189Val-pistemutaatio), solut ovat peräisin eri yksilöiltä. Johdannon kertauksena, potilaiden taudinkuvassa *in vivo* esiintyy fenotyyppistä yksilötason vaihtelua, ja näin on myös *in vitro*. On siis selkeää, että transkriptomiikan erot syntyvät satunnaisilla solulinjaeroilla; erilaistumissuunta on sama, mutta solut saavuttavat tietyt pisteet eri tahdissa.

On huomioitava, että tutkimuksessa käytetyt indusoidut pluripotentit kantasolut ovat karyotyyppiä XX. Tutkimustiedon mukaan Ala189Val-mutaatioiden fertiliteettiä alentava vaikutus ei ole miehillä yhtä korostunut kuin naisilla (Tranchant ym. 2011) ja eroja solujen vasteissa FSH-stimulaatiolle saattaa esiintyä, joten voisi olla mielenkiintoista toteuttaa vastaava koeasetelma XY-karyotyypin iPS-linjalla. *FSHR*:n eri transkriptien vaikutusta sukupuolten välillä ei ole liiemmin tutkittu, ja miehillä voi hyvinkin olla erilainen transkriptien ilmentymisprofiili kuin naisilla. Myös eräs mielenkiintoinen ajatus potilaslinjojen tutkimiseen olisi nykyisten iPS-teknologialla tuotettujen solujen vertailu villityypin soluihin, joihin *FSHR*-mutaatio on ensin indusoitu CRISPR/Cas9-genominmuokkausmenetelmillä. Tämän jälkeen aiheutettu *FSHR*-mutaatio voitaisiin yrittää korjata samalla teknologialla. Näin tautimallinnusta saataisiin entisestään tarkennettua.

## **Tulkinnan sudenkuopat ja tarvittavat analysointimenetelmät**

### **Vaihtelu toistojen välillä**

Etenkin kokeiden loppua kohden useiden tutkittujen geenien ekspressiossa näyttää esiintyvän paljon vaihtelua. Tästä voitaisiin päätellä, että mitä pidemmälle solut erilaistuvat, sitä useampaan suuntaan kehitys hajaantuu. Toisaalta *in vivo* kudoksien erilaistumiseen ja mitä luultavimmin sitä mallintavien järjestelmien kehitykseen kuuluu jatkuvan valinnan alla oleminen (mihin suuntaan erilaistua, mitkä solut kuolevat ja niin edelleen), joten vaihtelu kuuluu kantasolubiologiaan. Tämä johtuu muun muassa pienistä eroista lähtösoluissa jo pluripotenssivaiheessa, kuten eroista solujen solusyklien vaiheissa tai erilaistumispotentialissa. Samaten erilaistumisen myötä merkityksettömiltäkin tuntuvilla seikoilla saattaa olla suuri vaikutus; erot pluripotenssin ylläpidossa, siirrostustiheydessä, viljelyolosuhteissa, siirrostusnumeroissa tai miksei RNA:n eristysmetodeissakin voivat kumuloitua vaihe vaiheelta ja vaikeuttaa tulosten suhteutusta toistoihin tai muihin tutkimuksiin. Näin pienilläkin asioilla saattaa olla ratkaiseva merkitys lopputuloksen tulkinnan kannalta.

Standardoinnin ohella kustakin kokeesta suoritettiin tieteen yleisperiaatteiden mukaisesti useita toistoja. Otskoon kasvaessa keskimääräisesti virheelliset tulokset pienenevät. Tästä syystä

hajontaluvuksi on valittu keskiarvon keskivirhe (SEM), sillä se kuvaa käytetyn keskiluvun todennäköistä kykyä ennustaa aitoa havaintoa, käytännössä siis arvioiden tuloksen luotettavuutta. Suuremmalla otoskoolla keskivirhe on pienempi ja samalla luottamusväli kapenee. Tutkielman laajuuden asettamat rajat otoskoolle tulevat tässä vastaan, mutta toistojen lisääminen kasvattaisi edelleen uskottavuutta. Sama erilaistumiskaava sekä FSH-stimulaatiotulosten samansuuntaisuus ja selkeä ero villityyppi- ja mutanttisolujen välillä näkyy kuitenkin toistoissa yhä uudelleen ja uudelleen. Tämä puhuu tulosten aitouden puolesta hyvin voimakkaasti.

### **Karakterisaatioon lisää menetelmiä**

Erilaistuneiden solujen identifiointi on vuorossa seuraavana. Tulokset viittaavat siihen, että *FSHR*-signaali on peräisin molempien protokollien erilaistuksissa mitä ilmeisemmin alkion ulkopuolisista soluista, ja näitä soluja erilaistuu enemmän D-protokollalla. Näiden solujen muista ominaisuuksista ei kuitenkaan tiedetä juuri mitään.

D-protokollan soluista olisi hyvä tutkia qPCR:llä uusia alkionulkoisia merkkigeenejä. Kuten johdannossa mainittiin, tutkimusten mukaan esimerkiksi *BRA* on alkion ulkopuolisen mesodermin ja sikiökalvojen merkkigeeni (Kispert & Herrmann 1994), mutta tämän geenin ilmentymistä ei toistaiseksi ole tutkittu D-protokollan soluista. Alkionulkoisia merkkigeenejä tunnetaan lukuisia muitakin, muun muassa mainitut *SOX7* ja *AFP*, joiden tutkiminen jäi myös tutkielman ulkopuolelle. Tarkasteluun voisi ottaa lisäksi kokonaan uusia geenejä. Tällaisia voisivat olla esimerkiksi hypoblastin tai primitiivisen endodermin *CER1*, *DAB2*, *LEFTY1* (Moerkamp ym. 2013), istukkaan ja alkionulkoisiin rakenteisiin liittyvä *KDR* tai vaikkapa napanuoran soluissa ilmentyvät *LAMB1*- tai *FGF5* (Hyslop ym. 2005). Tämän ohella keskeistä voisi olla löytää uusia merkkigeenejä, joiden ilmentymistä FSH säätelisi. Yksi vaihtoehto voisi olla protokollan kehittäminen tai korvaaminen toisella. Tutkimusryhmässä onkin käyty keskustelua koeasetelman toistamisesta nimenomaan alkionulkoisten solujen erilaistamiseen tarkoitetulla protokollalla ja *FSHR*-ekspression tutkimisesta erilaistuneista soluista. Mikäli ekspressiota ilmeni D-protokollan soluihin verraten samalla tai korkeammalla tasolla, tutkielmani teoria *FSHR*:n ekspression alkionulkoisesta taustasta vakiinnuttaisi asemaansa.

Tutkimusryhmässä on parhaillaan käynnissä yhteistyö professori Juha Partasen tutkimusryhmän kanssa, aikeena tutkia ja yksilöidä D-protokollan soluja spesifisellä RNA-sekvensointimenetelmällä. Menetelmä perustuu solujen sieppaukseen ja viivakooditukseen pisaroissa, joiden sisällä normaali RT-reaktio tapahtuu viivakooditettujen alukkeiden avulla (Klein ym. 2015). Tämän odotetaan vauhdittavan heterogeenisten solupopulaatioiden tunnistusta sekä selkeyttävän geenien ja signaalinvälitysketjujen välisiä säätelysuhteita.

## 5. Johtopäätökset

Tutkielmani toivottiin vastaavan kysymyksiin aiemmin havaitun *FSHR*-ekspression alkuperästä sekä selvittävän *FSHR*:n mahdollista roolia pluripotenttien kantasolulinjojen erilaistumisessa. Tutkimustulokset sukurauhasten ulkopuolisesta geeniekspressiosta ovat harvassa, eikä reseptorien funktionaalisuutta muissa kuin primaarisolulinjoissa ole juurikaan tutkittu.

Tähänastiset tutkimustulokset ovat osoittaneet, että olemme onnistuneet erilaistamaan soluja, jotka ilmentävät endogeenisesti *FSHR*-geeniä korkealla tasolla. Tulosten perusteella ekspressiota esiintyy etenkin D-protokollan erilaistuneissa soluissa, jotka ilmentävät piirteitä alkionulkoisista soluista. *FSHR*:llä saattaa olla regulatiivisia tehtäviä tällaisten solujen erilaistumisessa. Villityypin kontrollisoluissa tuotettu reseptoriproteiini on funktionaalinen, eli eksogeeninen FSH-annostelu johtaa jo kohtalaisen matalilla pitoisuuksilla reseptorin aktivoitumisen myötä signaalinvälitysketjun etenemiseen ja cAMP-tuotantoon. Mutaatiota kantavissa potilaslinjoissa *FSHR* on ekspressoituna, mutta solunsisäisistä ongelmista johtuen reseptorit eivät ole toimintakykyisiä. Trofoblastiprotokollan soluissa *FSHR*-geeniä ilmennetään matalammalla tasolla, ja proteiini on osoittautunut toimintakyvyttömäksi.

*FSHR*:n merkitys pluripotenttien kantasolujen erilaistumisessa sekä näiden solujen tarkka määrittäminen on vielä kesken, mutta tulevien yhteistöiden ja analysointimenetelmien odotetaan valottavan hämärään jääneitä yksityiskohtia.

## Kiitokset

Haluan kiittää tutkielmani rahoitukseen osallistunutta Sigrid Juséliuksen säätiötä. Samoin on mainittava suuri kiitos professori Juha Tapanaiselle ja dosentti Timo Tuurille alkuun tilaisuudesta päästä harjoitteluun tutkimusryhmäänne ja myöhemmin monipuolisesti haastavasta ja mielenkiintoisesta aiheesta tutkielmalleni. Valtava kiitos koko tutkimusryhmälle, eritoten Karolina Lundin, Kirsi Sepponen ja Katri Knuus, kiitos kaikesta avusta, tuesta, neuvoista ja hyvästä työhengestä! Kiitos BSCC:lle ja Kaisu Luirolle tutkielman potilasperäisistä soluista.

Kiitos lukioaikaiselle biologian opettajalleni, jonka kannustuksen myötä maailmankuvani sai vahvan tiedepainotteisen alustan. Kiitos Sara Häklille, joka hikoili vierelläni pääsykokeisiin lukiessa – ja iloitsi kanssani, kun pääsin aikanaan sisään yliopistoon varasijalta. Kiitos Mika Nurmikolulle tuesta ja kokonaisvaltaisesta ideoinnista sekä Tanja Vanhelolle tutkielman oikoluvusta. Kiitos kuuluu lisäksi perheelleni ja ystävilleni rohkaisusta ja ymmärryksestä, niin tutkielman kuin muidenkin opintojen aikana.

## Kirjallisuus

- Aagaard K., Hamilton M., Seferovic M., Racusin D. & McGuire S. Why is the placenta not a fetus? Identifying silenced gene targets in the placenta at a transcriptome-wide scale using AGO-CLIP sequencing technology. 2016. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 214(1): S189–S190.
- Adachi K., Ezashi T., Kawana K., Roberts R., Osuga Y. & Fujii T. Establishment of trophoblast cells derived from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. 2016. *Placenta*. 46: 120–121.
- Adjaye J., Huntriss J., Herwig R., BenKahla A., Brink T.C., Wierling C., Hultschig C., Groth D., Yaspo M. & Picton H.M. Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. 2005. *Stem Cells*. 23(10): 1514–1525.
- Agrawal V., Jaiswal M.K. & Jaiswal Y.K. Gonadal and nongonadal FSHR and LHR dysfunction during lipopolysaccharide induced failure of blastocyst implantation in mouse. 2012. *J.Assist.Reprod.Genet.* 29(2): 163–173.
- Aittomäki K., Herva R., Stenman U., Juntunen K., Ylöstalo P., Hovatta O. & de la Chapelle A. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. 1996. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 81(10): 3722–3726.
- Aittomäki K., Lucena J.D., Pakarinen P., Sistonen P., Tapanainen J., Gromoll J., Kaskikari R., Sankila E., Lehväslaiho H. & Engel A.R. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. 1995. *Cell*. 82(6): 959–968.
- Amita M., Adachi K., Alexenko A.P., Sinha S., Schust D.J., Schulz L.C., Roberts R.M. & Ezashi T. Complete and unidirectional conversion of human embryonic stem cells to trophoblast by BMP4. 2013. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 110(13): E1212–21.
- Baccetti B., Collodel G., Costantino-Ceccarini E., Eshkol A., Gambera L., Moretti E., Strazza M. & Piomboni P. Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis. 1998. *FASEB J.* 12(11): 1045–1054.
- Barnes R.M., Firulli B.A., Conway S.J., Vincentz J.W. & Firulli A.B. Analysis of the Hand1 cell lineage reveals novel contributions to cardiovascular, neural crest, extra-embryonic, and lateral mesoderm derivatives. 2010. *Developmental Dynamics*. 239(11): 3086–3097.

- Barut F., Barut A., Gun B.D., Kandemir N.O., Harma M.I., Harma M., Aktunc E. & Ozdamar S.O. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. 2010. *Diagnostic pathology*. 5(1): 24.
- Beau I., Touraine P., Meduri G., Gougeon A., Desroches A., Matuchansky C., Milgrom E., Kuttenn F. & Misrahi M. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. 1998. *J.Clin.Invest*. 102(7): 1352–1359.
- Beddington R.S. & Robertson E.J. Axis development and early asymmetry in mammals. 1999. *Cell*. 96(2): 195–209.
- Bernardo A.S., Faial T., Gardner L., Niakan K.K., Ortmann D., Senner C.E., Callery E.M., Trotter M.W., Hemberger M. & Smith J.C. BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. 2011. *Cell stem cell*. 9(2): 144–155.
- Borbely A.U., Sandri S., Fernandes I.R., Prado K.M., Cardoso E.C., Correa-Silva S., Albuquerque R., Knöfler M., Beltrão-Braga P. & Campa A. The term basal plate of the human placenta as a source of functional extravillous trophoblast cells. 2014. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 12(1): 7.
- Boudjenah R., Molina-Gomes D., Torre A., Boitrelle F., Taieb S., Dos Santos E., Wainer R., de Mazancourt P., Selva J. & Vialard F. Associations between Individual and combined polymorphisms of the TNF and VEGF genes and the embryo implantation rate in patients undergoing in vitro fertilization (IVF) programs. 2014. *PloS one*. 9(9): e108287.
- Brown S., Teo A., Pauklin S., Hannan N., Cho C.H., Lim B., Vardy L., Dunn N., Trotter M. & Pedersen R. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. 2011. *Stem Cells*. 29(8): 1176–1185.
- Chawengsaksophak K., de Graaff W., Rossant J., Deschamps J. & Beck F. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. 2004. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 101(20): 7641–7645.
- Chen Y., Wang K., Chandramouli G.V., Knott J.G. & Leach R. Trophoblast lineage cells derived from human induced pluripotent stem cells. 2013. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. 436(4): 677–684.
- Chen Y., Wang K., Gong Y.G., Khoo S.K. & Leach R. Roles of CDX2 and EOMES in human induced trophoblast progenitor cells. 2013. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. 431(2): 197–202.

- Ciruna B. & Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. 2001. *Developmental cell*. 1(1): 37–49.
- Clayton R. Mechanism of GnRH action in gonadotrophs. 1988. *Human Reproduction*. 3(4): 479–483.
- Cross J.C. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. 2000. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 11(2): 105–113.
- Das P., Ezashi T., Schulz L.C., Westfall S.D., Livingston K.A. & Roberts R.M. Effects of FGF2 and oxygen in the BMP4-driven differentiation of trophoblast from human embryonic stem cells. 2007. *Stem Cell Research*. 1(1): 61–74.
- Dash P.R., Cartwright J.E., Baker P.N., Johnstone A.P. & Whitley G.S.J. Nitric oxide protects human extravillous trophoblast cells from apoptosis by a cyclic GMP-dependent mechanism and independently of caspase 3 nitrosylation. 2003. *Exp. Cell Res.* 287(2): 314–324.
- Dias J.A., Cohen B.D., Lindau-Shepard B., Nechamen C.A., Peterson A.J. & Schmidt A. Molecular, structural, and cellular biology of follitropin and follitropin receptor. 2002. *Vitamins & Hormones*. 64: 249–322.
- Dias J.A., Mahale S.D., Nechamen C.A., Davydenko O., Thomas R.M. & Ulloa-Aguirre A. Emerging roles for the FSH receptor adapter protein APPL1 and overlap of a putative 14-3-3 $\tau$  interaction domain with a canonical G-protein interaction site. 2010. *Mol. Cell. Endocrinol.* 329(1): 17–25.
- Doherty E., Pakarinen P., Tiitinen A., Kiilavuori A., Huhtaniemi I., Forrest S. & Aittomäki K. A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. 2002. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(3): 1151–1155.
- Douglas G.C., VandeVoort C.A., Kumar P., Chang T.C. & Golos T.G. Trophoblast stem cells: models for investigating trophoblast differentiation and placental development. 2009. *Endocr. Rev.* 30(3): 228–240.
- Drukker M., Tang C., Ardehali R., Rinkevich Y., Seita J., Lee A.S., Mosley A.R., Weissman I.L. & Soen Y. Isolation of primitive endoderm, mesoderm, vascular endothelial and trophoblast progenitors from human pluripotent stem cells. 2012. *Nat. Biotechnol.* 30(6): 531–542.
- El-Hashash A.H., Warburton D. & Kimber S.J. Genes and signals regulating murine trophoblast cell development. 2010. *Mech. Dev.* 127(1): 1–20.



- Evans J.J. Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. 1999. *Endocr.Rev.* 20(1): 46–67.
- Firulli A.B., McFadden D.G., Lin Q., Srivastava D. & Olson E.N. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. 1998. *Nat.Genet.* 18(3): 266–270.
- Fong C., Subramanian A., Biswas A., Gauthaman K., Srikanth P., Hande M.P. & Bongso A. Derivation efficiency, cell proliferation, freeze–thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton’s jelly stem cells. 2010. *Reproductive biomedicine online.* 21(3): 391–401.
- Futaki S., Hayashi Y., Emoto T., Weber C.N. & Sekiguchi K. Sox7 plays crucial roles in parietal endoderm differentiation in F9 embryonal carcinoma cells through regulating Gata-4 and Gata-6 expression. 2004. *Mol.Cell.Biol.* 24(23): 10492–10503.
- Gerami-Naini B., Dovzhenko O.V., Durning M., Wegner F.H., Thomson J.A. & Golos T.G. Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. 2004. *Endocrinology.* 145(4): 1517–1524.
- Giakoumopoulos M. & Golos T.G. Embryonic stem cell-derived trophoblast differentiation: a comparative review of the biology, function, and signaling mechanisms. 2013. *J.Endocrinol.* 216(3): R33–45.
- Gilbert S.F. Developmental Biology. 2013. *Sinauer Associates.* 10th Edition.
- Goldman-Wohl D. & Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. 2002. *Mol.Cell.Endocrinol.* 187(1): 233–238.
- Golos T., Giakoumopoulos M. & Gerami-Naini B. Review: Trophoblast differentiation from human embryonic stem cells. 2013. *Placenta.* 34: S56–S61.
- Gromoll J., Pekel E. & Nieschlag E. The structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) gene. 1996. *Genomics.* 35(2): 308–311.
- Gromoll J. & Simoni M. Genetic complexity of FSH receptor function. 2005. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 16(8): 368–373.
- Heazell A. & Crocker I. Live and let die–regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. 2008. *Placenta.* 29(9): 772–783.

- Hemberger M., Udayashankar R., Tesar P., Moore H. & Burton G.J. ELF5-enforced transcriptional networks define an epigenetically regulated trophoblast stem cell compartment in the human placenta. 2010. *Hum.Mol.Genet.* 19(12): 2456–2467.
- Hermann B.P., Hornbaker K.I., Maran R.R. & Heckert L.L. Distal regulatory elements are required for Fshr expression, in vivo. 2007. *Mol.Cell.Endocrinol.* 260: 49–58.
- Horii M., Li Y., Wakeland A.K., Pizzo D.P., Nelson K.K., Sabatini K., Laurent L.C., Liu Y. & Parast M.M. Human pluripotent stem cells as a model of trophoblast differentiation in both normal development and disease. 2016. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 113(27): E3882–91.
- Huhtaniemi I.T. & Aittomäki K. Mutations of follicle-stimulating hormone and its receptor: effects on gonadal function. 1998. *Eur.J.Endocrinol.* 138(5): 473–481.
- Huppertz B., Kadyrov M. & Kingdom J.C. Apoptosis and its role in the trophoblast. 2006. *Obstet.Gynecol.* 195(1): 29–39.
- Hyslop L., Stojkovic M., Armstrong L., Walter T., Stojkovic P., Przyborski S., Herbert M., Murdoch A., Strachan T. & Lako M. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. 2005. *Stem Cells.* 23(8): 1035–1043.
- Inman K.E. & Downs K.M. Brachyury is required for elongation and vasculogenesis in the murine allantois. 2006. *Development.* 133(15): 2947–2959.
- Jedrusik A., Cox A., Wicher K.B., Glover D.M. & Zernicka-Goetz M. Maternal-zygotic knockout reveals a critical role of Cdx2 in the morula to blastocyst transition. 2015. *Dev.Biol.* 398(2): 147–152.
- Ji L., Brkić J., Liu M., Fu G., Peng C. & Wang Y. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. 2013. *Mol.Aspects Med.* 34(5): 981–1023.
- Jiang X., Dreano M., Buckler D.R., Cheng S., Ythier A., Wu H., Hendrickson W.A. & El Tayar N. Structural predictions for the ligand-binding region of glycoprotein hormone receptors and the nature of hormone–receptor interactions. 1995. *Structure.* 3(12): 1341–1353.
- John R. & Hemberger M. A placenta for life. 2012. *Reproductive biomedicine online.* 25(1): 5–11.
- Katritch V., Cherezov V. & Stevens R.C. Structure-function of the G protein–coupled receptor superfamily. 2013. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 53: 531–556.

- Kispert A. & Herrmann B.G. Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. 1994. *Dev.Biol.* 161(1): 179–193.
- Klein A.M., Mazutis L., Akartuna I., Tallapragada N., Veres A., Li V., Peshkin L., Weitz D.A. & Kirschner M.W. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. 2015. *Cell.* 161(5): 1187–1201.
- Kleinau G. & Krause G. Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors: structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms. 2009. *Endocr.Rev.* 30(2): 133–151.
- Knöfler M., Meinhardt G., Bauer S., Loregger T., Vasicek R., Bloor D.J., Kimber S.J. & Husslein P. Human Hand1 basic helix-loop-helix (bHLH) protein: extra-embryonic expression pattern, interaction partners and identification of its transcriptional repressor domains. 2002. *Biochem.J.* 361(3): 641–651.
- Koel M., Võsa U., Krjutškov K., Einarsdottir E., Kere J., Tapanainen J., Katayama S., Ingerpuu S., Jaks V. & Stenman U. Optimizing bone morphogenic protein 4-mediated human embryonic stem cell differentiation into trophoblast-like cells using fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor- $\beta$ /activin/nodal signalling inhibition. 2017. *Reproductive BioMedicine Online*.
- Koutsourakis M., Langeveld A., Patient R., Beddington R. & Grosveld F. The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. 1999. *Development.* 126(4): 723–732.
- Kumar T.R. Extragonadal FSH receptor: is it real? 2014. *Biol.Reprod.* 91(4): 99.
- Kunath T., Saba-El-Leil M.K., Almousailleakh M., Wray J., Meloche S. & Smith A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. 2007. *Development.* 134(16): 2895–2902.
- Lee C.Q., Gardner L., Turco M., Zhao N., Murray M.J., Coleman N., Rossant J., Hemberger M. & Moffett A. What is trophoblast? A combination of criteria define human first-trimester trophoblast. 2016. *Stem cell reports.* 6(2): 257–272.
- Lee W., Yoon S., Yoon T., Cha K., Lee S., Shimasaki S., Lee S. & Lee K. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. 2004. *Mol.Reprod.Dev.* 69(2): 159–163.

- Li L., Wang J., Hou J., Wu Z., Zhuang Y., Lu M., Zhang Y., Zhou X., Li Z. & Xiao W. Cdk1 interplays with Oct4 to repress differentiation of embryonic stem cells into trophectoderm. 2012. *FEBS Lett.* 586(23): 4100–4107.
- Li Y., Moretto-Zita M., Soncin F., Wakeland A., Wolfe L., Leon-Garcia S., Pandian R., Pizzo D., Cui L., Nazor K., Loring J.F., Crum C.P., Laurent L.C. & Parast M.M. BMP4-directed trophoblast differentiation of human embryonic stem cells is mediated through a DeltaNp63<sup>+</sup> cytotrophoblast stem cell state. 2013. *Development.* 140(19): 3965–3976.
- Liu J., Luo X., Xu Y., Gu J., Tang F., Jin Y. & Li H. Single-stranded DNA binding protein Ssbp3 induces differentiation of mouse embryonic stem cells into trophoblast-like cells. 2016. *Stem cell research & therapy.* 7(1): 79.
- Livak K.J. & Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. 2001. *Methods.* 25(4): 402–408.
- Loh K.M., Ang L.T., Zhang J., Kumar V., Ang J., Auyeong J.Q., Lee K.L., Choo S.H., Lim C.Y. & Nichane M. Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations. 2014. *Cell stem cell.* 14(2): 237–252.
- Lu C.C., Brennan J. & Robertson E.J. From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. 2001. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 11(4): 384–392.
- Lussiana C., Guani B., Mari C., Restagno G., Massobrio M. & Revelli A. Mutations and polymorphisms of the FSH receptor (FSHR) gene: clinical implications in female fecundity and molecular biology of FSHR protein and gene. 2008. *Obstet.Gynecol.Surv.* 63(12): 785–795.
- Ma G.T., Roth M.E., Groskopf J.C., Tsai F.Y., Orkin S.H., Grosveld F., Engel J.D. & Linzer D.I. GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. 1997. *Development.* 124(4): 907–914.
- Mae S., Shono A., Shiota F., Yasuno T., Kajiwarra M., Gotoda-Nishimura N., Arai S., Sato-Otubo A., Toyoda T. & Takahashi K. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. 2013. *Nature communications.* 4: 1367.
- McMaster M.T., Librach C.L., Zhou Y., Lim K.H., Janatpour M.J., DeMars R., Kovats S., Damsky C. & Fisher S.J. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. 1995. *J.Immunol.* 154(8): 3771–3778.

- Miyoshi T., Otsuka F., Suzuki J., Takeda M., Inagaki K., Kano Y., Otani H., Mimura Y., Ogura T. & Makino H. Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. 2006. *Biol.Reprod.* 74(6): 1073–1082.
- Miyazono K., Kamiya Y. & Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. 2010. *J.Biochem.* 147(1): 35–51.
- Moerkamp A.T., Paca A., Goumans M.J., Kunath T., Kruithof B.P. & Kruithof-de Julio M. Extraembryonic endoderm cells as a model of endoderm development. 2013. *Dev.Growth Differ.* 55(3): 301–308.
- Nataraja S.G., Henry N.Y. & Palmer S.S. Discovery and development of small molecule allosteric modulators of glycoprotein hormone receptors. 2015. *Frontiers in endocrinology.* 6(142): 1–15.
- Nazor K.L., Altun G., Lynch C., Tran H., Harness J.V., Slavin I., Garitaonandia I., Müller F., Wang Y. & Boscolo F.S. Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives. 2012. *Cell stem cell.* 10(5): 620–634.
- Ng R.K., Dean W., Dawson C., Lucifero D., Madeja Z., Reik W. & Hemberger M. Epigenetic restriction of embryonic cell lineage fate by methylation of Elf5. 2008. *Nat.Cell Biol.* 10(11): 1280–1290.
- Niakan K.K. & Eggan K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. 2013. *Dev.Biol.* 375(1): 54–64.
- Niwa H., Toyooka Y., Shimosato D., Strumpf D., Takahashi K., Yagi R. & Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. 2005. *Cell.* 123(5): 917–929.
- Ohi Y., Qin H., Hong C., Blouin L., Polo J.M., Guo T., Qi Z., Downey S.L., Manos P.D. & Rossi D.J. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. 2011. *Nat.Cell Biol.* 13(5): 541–549.
- Otsuka F., Yamamoto S., Erickson G.F. & Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. 2001. *J.Biol.Chem.* 276(14): 11387–11392.
- Pansky B. Review of Medical Embryology. 1982. MacMillan Publishing USA. 14–15.

- Patsoula E., Loutradis D., Drakakis P., Michalas L., Bletsas R. & Michalas S. Messenger RNA expression for the follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor in human oocytes and preimplantation-stage embryos. 2003. *Fertil.Steril.* 79(5): 1187–1193.
- Pera M.F., Andrade J., Houssami S., Reubinoff B., Trounson A., Stanley E.G., Ward-van Oostwaard D. & Mummery C. Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. 2004. *J.Cell.Sci.* 117(7): 1269–1280.
- Pfeffer P.L. & Pearton D.J. Trophoblast development. 2012. *Reproduction.* 143(3): 231–246.
- Plunkett J., Doniger S., Orabona G., Morgan T., Haataja R., Hallman M., Puttonen H., Menon R., Kuczynski E. & Norwitz E. An evolutionary genomic approach to identify genes involved in human birth timing. 2011. *PLoS Genetics.* 7(4): 1–10.
- Radu A., Pichon C., Camparo P., Antoine M., Allory Y., Couvelard A., Fromont G., Hai M.T.V. & Ghinea N. Expression of follicle-stimulating hormone receptor in tumor blood vessels. 2010. *N.Engl.J.Med.* 363(17): 1621–1630.
- Ralston A. & Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophoblast fate in the early mouse embryo. 2008. *Dev.Biol.* 313(2): 614–629.
- Rannikko A., Pakarinen P., Manna P.R., Beau I., Misrahi M., Aittomäki K. & Huhtaniemi I. Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation. 2002. *Mol.Hum.Reprod.* 8(4): 311–317.
- Rivera-Pérez J.A. & Magnuson T. Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3. 2005. *Dev.Biol.* 288(2): 363–371.
- Roberts R.M., Ezashi T. & Das P. Trophoblast gene expression: transcription factors in the specification of early trophoblast. 2004. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2(1): 47.
- Roberts R.M. & Fisher S.J. Trophoblast Stem Cells 1. 2011. *Biol.Reprod.* 84(3): 412–421.
- Roberts R.M., Loh K.M., Amita M., Bernardo A.S., Adachi K., Alexenko A.P., Schust D.J., Schulz L.C., Telugu B.P., Ezashi T. & Pedersen R.A. Differentiation of trophoblast cells from human embryonic stem cells: to be or not to be? 2014. *Reproduction.* 147(5): D1–12.
- Roper S. & Hemberger M. Defining pathways that enforce cell lineage specification in early development and stem cells. 2009. *Cell Cycle.* 8(10): 1515–1525.

- Rossant J. Development of the extraembryonic lineages. 1995. *Seminars in Developmental Biology*. 6(4): 237–247.
- Rossant J. & Cross J.C. Placental development: lessons from mouse mutants. 2001. *Nature Reviews Genetics*. 2(7): 538–548.
- Saito S. & Nakashima A. A review of the mechanism for poor placentation in early-onset preeclampsia: the role of autophagy in trophoblast invasion and vascular remodeling. 2014. *J.Reprod.Immunol*. 101: 80–88.
- Sariola H., Frilander M., Heino T., Jernvall J., Partanen J., Sainio K., Salminen M. & Thesleff I. Kehitysbiologia, solusta yksilöksi. 2015. *Duodecim*.
- Sarkar P. Trophoblast Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. 2013. Väitöskirja. North Carolina State University.
- Sarkar P., Mischler A., Randall S.M., Collier T.S., Dorman K.F., Boggess K.A., Muddiman D.C. & Rao B.M. Identification of epigenetic factor proteins expressed in human embryonic stem cell-derived trophoblasts and in human placental trophoblasts. 2016. *Journal of Proteome Research*. 15(8): 2433–2444.
- Schulz L., Ezashi T., Das P., Westfall S., Livingston K. & Roberts R. Human embryonic stem cells as models for trophoblast differentiation. 2008. *Placenta*. 29: 10–16.
- Sepponen K., Lundin K., Knuus K., Väyrynen P., Raivio T., Tapanainen J. & Tuuri T. The Role of Sequential BMP Signaling in Directing Human Embryonic Stem cells to Bipotential Gonadal Cells. 2017. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 102(11): 4303–4314.
- Shahbazi M.N., Jedrusik A., Vuoristo S., Recher G., Hupalowska A., Bolton V., Fogarty N.M., Campbell A., Devito L.G. & Ilic D. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. 2016. *Nature Cell Biology*. 18(6): 700–708.
- Shi G. & Jin Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. 2010. *Stem cell research & therapy*. 1(5): 39.
- Shirley M.L., Venable A., Rao R.R., Boyd N.L., Stice S.L., Puett D. & Narayan P. Bone morphogenetic protein-4 affects both trophoblast and non-trophoblast lineage-associated gene expression in human embryonic stem cells. 2012. *Stem Cell Discovery*. 2(04): 163.

Shpiz A., Ben-Yosef D. & Kalma Y. Impaired function of trophoblast cells derived from translocated hESCs may explain pregnancy loss in women with balanced translocation (11; 22). 2016. *J.Assist.Reprod.Genet.* 33(11): 1493–1499.

Simoni M., Gromoll J. & Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. 1997. *Endocr.Rev.* 18(6): 739–773.

Simoni M. & Nieschlag E. FSH in therapy: physiological basis, new preparations and clinical use. 1995. *Reproductive Medicine Review.* 4(3): 163–177.

Skaper S.D., Kee W.J., Facci L., Macdonald G., Doherty P. & Walsh F.S. The FGFR1 Inhibitor PD 173074 Selectively and Potently Antagonizes FGF-2 Neurotrophic and Neurotropic Effects. 2000. *J.Neurochem.* 75(4): 1520–1527.

Solloway M.J. & Robertson E.J. Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. 1999. *Development.* 126(8): 1753–1768.

Soncin F., Natale D. & Parast M.M. Signaling pathways in mouse and human trophoblast differentiation: a comparative review. 2015. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 72(7): 1291–1302.

Steinberg M.L. & Robins J.C. Cellular Models of Trophoblast Differentiation. 2016. *Semin.Reprod.Med.* 34(1): 50–56.

Stilley J.A., Christensen D.E., Dahlem K.B., Guan R., Santillan D.A., England S.K., Al-Hendy A., Kirby P.A. & Segaloff D.L. FSH receptor (FSHR) expression in human extragonadal reproductive tissues and the developing placenta, and the impact of its deletion on pregnancy in mice. 2014a. *Biol.Reprod.* 91(3): 74.

Stilley J.A., Guan R., Duffy D.M. & Segaloff D.L. Signaling through FSH receptors on human umbilical vein endothelial cells promotes angiogenesis. 2014b. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 99(5): E813–E820.

Strumpf D., Mao C.A., Yamanaka Y., Ralston A., Chawengsaksophak K., Beck F. & Rossant J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. 2005. *Development.* 132(9): 2093–2102.

Sudheer S., Bhushan R., Fauler B., Lehrach H. & Adjaye J. FGF inhibition directs BMP4-mediated differentiation of human embryonic stem cells to syncytiotrophoblast. 2012. *Stem cells and development.* 21(16): 2987–3000.



- Sunahara R.K., Dessauer C.W. & Gilman A.G. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. 1996. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 36(1): 461–480.
- Takahashi K. & Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. 2006. *Cell.* 126(4): 663–676.
- Tapanainen J.S., Aittomäki K., Min J., Vaskivuo T. & Huhtaniemi I.T. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. 1997. *Nat.Genet.* 15(2): 205–206.
- Tapanainen J.S., Vaskivuo T., Aittomäki K. & Huhtaniemi I.T. Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction. 1998. *Mol.Cell.Endocrinol.* 145(1): 129–135.
- Tarkowski A.K., Suwińska A., Czołowska R. & Ożdżeński W. Individual blastomeres of 16-and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. 2010. *Dev.Biol.* 348(2): 190–198.
- Telugu B., Adachi K., Schlitt J., Ezashi T., Schust D., Roberts R. & Schulz L. Comparison of extravillous trophoblast cells derived from human embryonic stem cells and from first trimester human placentas. 2013. *Placenta.* 34(7): 536–543.
- Themmen A.P. & Huhtaniemi I.T. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. 2000. *Endocr.Rev.* 21(5): 551–583.
- Themmen A.P. An update of the pathophysiology of human gonadotrophin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. 2005. *Reproduction.* 130(3): 263–274.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S. & Jones J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. 1998. *Science.* 282(5391): 1145–1147.
- Tiruthani K., Sarkar P. & Rao B. Trophoblast differentiation of human embryonic stem cells. 2013. *Biotechnology journal.* 8(4): 421–433.
- Touraine P., Beau I., Gougeon A., Meduri G., Desroches A., Pichard C., Detoef M., Paniel B., Prieur M. & Zorn J. New natural inactivating mutations of the follicle-stimulating hormone receptor: correlations between receptor function and phenotype. 1999. *Molecular Endocrinology.* 13(11): 1844–1854.

- Tranchant T., Durand G., Gauthier C., Crépieux P., Ulloa-Aguirre A., Royère D. & Reiter E. Preferential  $\beta$ -arrestin signalling at low receptor density revealed by functional characterization of the human FSH receptor A189 V mutation. 2011. *Mol.Cell.Endocrinol.* 331(1): 109–118.
- Trehan A., Rotgers E., Coffey E.T., Huhtaniemi I. & Rivero-Müller A. CANDLES, an assay for monitoring GPCR induced cAMP generation in cell cultures. 2014. *Cell Communication and Signaling.* 12(1): 1.
- Ulloa-Aguirre A. & Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. 1998. *Hum.Reprod.Update.* 4(3): 260–283.
- Ulloa-Aguirre A., Zariñán T., Pasapera A.M., Casas-González P. & Dias J.A. Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. 2007. *Endocrine.* 32(3): 251–263.
- Ulloa-Aguirre A., Dias J.A., Bousfield G., Huhtaniemi I. & Reiter E. Trafficking of the follitropin receptor. 2013. *Methods Enzymol.* 521: 17–45.
- Vallier L., Touboul T., Chng Z., Brimpari M., Hannan N., Millan E., Smithers L.E., Trotter M., Rugg-Gunn P. & Weber A. Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. 2009. *PloS one.* 4(6): e6082.
- Vaskivuo T.E., Aittomäki K., Anttonen M., Ruokonen A., Herva R., Osawa Y., Heikinheimo M., Huhtaniemi I. & Tapanainen J.S. Effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotropin in individuals with an inactivating mutation of the FSH receptor. 2002. *Fertil.Steril.* 78(1): 108–113.
- Watanabe K., Ueno M., Kamiya D., Nishiyama A., Matsumura M., Wataya T., Takahashi J.B., Nishikawa S., Nishikawa S. & Muguruma K. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. 2007. *Nat.Biotechnol.* 25(6): 681–686.
- Wilson K.D. & Wu J.C. Induced pluripotent stem cells. 2015. *JAMA.* 313(16): 1613–1614.
- Wu Z., Zhang W., Chen G., Cheng L., Liao J., Jia N., Gao Y., Dai H., Yuan J., Cheng L. & Xiao L. Combinatorial signals of activin/nodal and bone morphogenic protein regulate the early lineage segregation of human embryonic stem cells. 2008. *J.Biol.Chem.* 283(36): 24991–25002.
- Xu R., Chen X., Li D.S., Li R., Addicks G.C., Glennon C., Zwaka T.P. & Thomson J.A. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. 2002. *Nat.Biotechnol.* 20(12): 1261–1264.

- Xu R., Peck R.M., Li D.S., Feng X., Ludwig T. & Thomson J.A. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. 2005. *Nature methods*. 2(3): 185–190.
- Yabe S., Alexenko A.P., Amita M., Yang Y., Schust D.J., Sadovsky Y., Ezashi T. & Roberts R.M. Comparison of syncytiotrophoblast generated from human embryonic stem cells and from term placentas. 2016. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 113(19): E2598–607.
- Yang Y., Adachi K., Sheridan M.A., Alexenko A.P., Schust D.J., Schulz L.C., Ezashi T. & Roberts R.M. Heightened potency of human pluripotent stem cell lines created by transient BMP4 exposure. 2015. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 112(18): E2337–46.
- Yoshino O., Shi J., Osuga Y., Harada M., Nishii O., Yano T. & Taketani Y. The function of bone morphogenetic proteins in the human ovary. 2011. *Reproductive Medicine and Biology*. 10(1): 1–7.
- Yoyooka Y., Oka S. & Fujimori T. Early preimplantation cells expressing Cdx2 exhibit plasticity of specification to TE and ICM lineages through positional changes. 2016. *Dev.Biol.* 411(1): 50.
- Yu P., Pan G., Yu J. & Thomson J.A. FGF2 sustains NANOG and switches the outcome of BMP4-induced human embryonic stem cell differentiation. 2011. *Cell stem cell*. 8(3): 326–334.
- Zdravkovic T., Nazor K.L., Larocque N., Gormley M., Donne M., Hunkapillar N., Giritharan G., Bernstein H.S., Wei G., Hebrok M., Zeng X., Genbacev O., Mattis A., McMaster M.T., Krtolica A., Valbuena D., Simon C., Laurent L.C., Loring J.F. & Fisher S.J. Human stem cells from single blastomeres reveal pathways of embryonic or trophoblast fate specification. 2015. *Development*. 142(23): 4010–4025.
- Zhang Y., Huang S., Dong W., Li L., Feng Y., Pan L., Han Z., Wang X., Ren G. & Su D. SOX7, down-regulated in colorectal cancer, induces apoptosis and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. 2009. *Cancer Lett.* 277(1): 29–37.
- Zhang P., Li J., Tan Z., Wang C., Liu T., Chen L., Yong J., Jiang W., Sun X., Du L., Ding M. & Deng H. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. 2008. *Blood*. 111(4): 1933–1941.

## LIITE 1. Materiaalit ja menetelmät

### DNaasi-käsittely:

**Taulukko 1.** DNaasi-reaktion liuoskomponentit.

Dnaasi-liuos / 60 µl RNA	
7,5 µl	RQ1 Dnase 10 x Buffer (Promega)
3 µl	Ribolock RNase Inhibitor 40 U/µl(Thermo Scientific)
4,5 µl	RQ1 RNase-free DNase 1 U/µl (Promega)
15 µl	

### Käänteiskopiointireaktio (RT-reaktio):

**Taulukko 2.** Reaktion liuoskomponentit.

RT-reaktioliuos / näyte	
4 µl	RT Buffer 10x (Promega)
2,5 µl	dNTP Mix á 2,5mM/dNTP (Thermo Scientific)
1 µl	Oligo (dt) 15 Primer 0,5 µg/µl (Promega)
0,5 µl	Random Primers 500 µg/ml (Promega)
0,5 µl	Ribolock RNase Inhibitor 40 U/µl (Thermo Scientific)
0,5 µl	M-MLV Reverse Transcriptase 200 U/µl (Promega)
11 µl	Sterile nuclease-free H <sub>2</sub> O + 2 µg RNA
20 µl	

### qPCR:

**Taulukko 3.** qPCR-liuoskomponentit.

qPCR-liuos / näyte	
4 µl	5 x HOT FIREPol®EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis Biodyne)
5 µl	2 µm Forward/Reverse Primer -liuos
10 µl	Nuclease-free H <sub>2</sub> O (Amresco)
1 µl	cDNA
20 µl	

### qPCR-ajon ohjelma

Entsyymien aktivaatio 15 min 95 °C

50 sykliä: 15 s 95 °C  
20 s 60 °C  
70 s 72 °C  
Sulaminen: 10 s 95 °C  
20 s 70 °C

**Taulukko 4.** qPCR-ajoissa käytetyt alukkeet.

Geeni	5'-pää (forward)	3'-pää (reverse)
<i>AFP</i>	CGCTGCAAACGATGAAGCAAG	AATCTGCAATGACAGCCTCAAG
<i>AMH</i>	TGCCATTCAATGGAACCCAACT	CGTGGAACACATCATTAGGCAAT
<i>BRA</i>	GCATGATCACCAGCCACTG	TTAAGAGCTGTGATCTCCTC
<i>CDX2</i>	CCAGCGGCGGAACCTGTG	GTCTTTCGTCTGCTGGTTTTCAC
<i>CYCLO G</i>	TCTTGTCAATGGCCAACAGAG	GCCCATCTAAATGAGGAGTTG
<i>DLX5</i>	TTTGCCATTACCATTTCTCA	CGCTAGCTCCTACCACCAGT
<i>EMX2</i>	GTCATCGCTTCCAAGGGAAC	GGCGTGTTCCAGCCTTAGAA
<i>FST</i>	TGAGGGAAAGTGTATCAAAGCAA	CGACTTACTGTCAGGGCACA
<i>FOXA2</i>	AAGACCTACAGGCGCAGCT	CATCTTGTTGGGGCTCTGC
<i>FSHR</i>	TGCCATTCAATGGAACCCAACT	CGTGGAACACATCATTAGGCAAT
<i>GATA3</i>	AACTCTGGAGGAGGAATGC	TTTTTCGGTTTCTGGTCTGG
<i>GATA4</i>	CAGGCGTTGCACAGATAGTG	CCCGACACCCCAATCTC
<i>GATA6</i>	CGCTGTTTGTGTTAGGGCTCGG	CCTCTTACTGCTCTGCCGGA
<i>HAND1</i>	AATCCTCTTCTCGACTGGGC	CCTTCAAGGCTGAACTCAAGA
<i>INHA</i>	CTCGGATGGAGGTTACTCTTTCAA	GAAGACCCCCCACCCTTAGA
<i>INHBA</i>	GGACATCGGCTGGAATGACT	GGCACTCACCTCGCAGTAG
<i>INHBB</i>	CCTGGGATCCTTCGTGCTT	GTTGTGTCTTTTCTGGGTCTCTTT
<i>KRT7</i>	GACATCGAGATCGCCACC	CCGGATGGAATAAGCCTTCA
<i>LHX1</i>	TCATGCAGGTGAAGCAGTTC	TCCAGGGAAGGCAAACCTCTA
<i>LHX9</i>	GCGAACCTCTTTCAAGCATC	TCCTTCTGAATTTGGCTCGT
<i>OCT4</i>	TTGGGCTCGAGAAGGATGTG	TCCTCTCGTTGTGCATAGTCG
<i>PAX2</i>	GGAAAGGCTGCTGAACTTTG	TATGTTTCGCCTGGGAGATTC
<i>SOX1</i>	CCCATGCACCGCTACGACAT	AGGGCGACGCGCTCATGTA
<i>SOX7</i>	GTCTCCATGATGTCCCCTGT	TGGAGTGGAGTGGGTGGTAG
<i>WT1</i>	GGCAGCACAGTGTGTGAACT	CCAGGCACACCTGGTAGTTT

**Taulukko 5.** qPCR-tulosten analysoimisessa käytetty komparatiivinen Cq-menetelmä.

Näyte	Cq-keskiarvo	<i>CYCLO G</i> Cq-keskiarvo	$\Delta Cq$	$\Delta\Delta Cq$	Arvo suhteutettuna d0-näytteeseen
d0	35,385	21,4	13,985	0	1
d6	24,35	22,755	1,595	-12,39	5367,371382
d8	25,145	22,68	2,465	-11,52	2936,740348

$$\Delta Cq = Cq\text{-keskiarvo} - \textit{CYCLO G} \text{ Cq-keskiarvo}$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq - \Delta Cq_{\text{d0-näyte}}$$

$$\text{Arvo suhteutettuna d0-näytteeseen} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$